

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Gizelle Cristina Bedendo

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CONTAMINANTES
ORGÂNICOS EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS E
AMBIENTAIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA
SUPOORTADA POR MEMBRANAS E DETECÇÃO POR LC-
MS/MS e GC-ECD**

Florianópolis

2010

Gizelle Cristina Bedendo

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CONTAMINANTES
ORGÂNICOS EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS E
AMBIENTAIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA
SUPORTADA POR MEMBRANAS E DETECÇÃO POR LC-
MS/MS e GC-ECD**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em
Química da Universidade
Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de
Doutor na área
de Química com ênfase em
Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo
Carasek da Rocha
Co-Orientador: Isabel Cristina
Sales Fontes Jardim

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

S237t Bedendo, Gizelle Cristina

Determinação de resíduos de contaminantes orgânicos em matrizes alimentícias e ambientais por microextração em fase líquida suportada por membrana e detecção por LC-MS/MS e GC-ECD.

[tese] / Gizelle Cristina Bedendo; orientador, Eduardo Carasek da Rocha. Co-orientadora, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.

Florianópolis, SC, 2010.

231 p.: il., tabs., grafs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Microextração em Fase Líquida. 3. Membranas. 4. Agrotóxicos. 5. Antibiótico. 6. Cromatografia I. Rocha, Eduardo Carasek da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Gizelle Cristina Bedendo

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CONTAMINANTES
ORGÂNICOS EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS E
AMBIENTAIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA
SUPORTADA POR MEMBRANAS E DETECÇÃO POR LC-
MS/MS e GC-ECD**

Esta tese foi julgada e aprovada para a
obtenção do título de Doutor em Química no
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Prof^a Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
Co-Orientadora

Profa. Dra. Berenice Junkes

Prof. Dra. Carol Hollingworth Collins
(Relatora)

Prof. Dra. Maria Marta de Souza Sierra

Prof. Dra. Maria Eugênia Queiroz

Prof. Dr. Valfredo Favare

**Esta obra é dedicada a todas as pessoas
que acreditam que a ciência é a
arte capaz de transformar o mundo.
Dedico-a, também, a minha família e amigos
que sempre estiveram ao meu lado.**

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao cosmos pela energia que me rege.

As pessoas que conheci nesses quatro anos e que me trataram com carinho, seja no trabalho, nas aulas e no lazer, especialmente para aquelas que construí uma amizade. Gostaria de poder citar todos, mas felizmente são muitos, então segue alguns que ficaram eternamente no meu coração: Valquíria, Vânia, Isadora, Tatiane, Letícia, Tiago Nobrega, Leandro Guarezi, Milena, Marcel, Daiane, Lucilía, Janio, Juan, Marcio Pozzobon e Serginho.

Aos amigos do laboratório 209 (UFSC), Jeferson, Marcel, Renata, Joyce, Edmar, Kalya e Dilma e aos amigos do LabCrom, Milena, Lucilía, Liane, Carla, Marcelo, Karen, Daniele, Elias e Marcel, que estiveram sempre presentes ao longo da minha jornada.

A todos os professores, especialmente àqueles com os quais tive a oportunidade de ter frequentado sua(s) disciplina(s). Obrigado pelos ensinamentos!

Ao professor Dr. Eduardo Carasek da Rocha, pela oportunidade, atenção e pela orientação dos trabalhos que realizei.

A professora Dra. Isabel Jardim, pela disponibilização do seu laboratório, seu tempo, carinho e atenção e pela orientação nos trabalhos que realizei.

Aos funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo auxílio que tive sempre quando precisei.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

À Universidade Estadual de Campinas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

*"Eu não sei o caminho para o sucesso;
mas, sem dúvida,
o caminho para o fracasso é agradar a
todo mundo"*

John Kennedy

RESUMO

A necessidade de análise dos mais diversos tipos de contaminantes nas mais variadas matrizes, assim como o desenvolvimento de novas técnicas analíticas, alavacam o desenvolvimento e o aprimoramento dos métodos analíticos desde o preparo da amostra até a sua análise final. Essas novas metodologias estão baseadas em conceitos que envolvem o consumo mínimo de solvente, simplicidade e menor tempo de análise mantendo as características de precisão e exatidão, assim como detectabilidade. Neste contexto, este estudo apresenta o uso da membrana microporosa de polipropileno como suporte para o desenvolvimento de métodos utilizando a microextração em fase líquida, que contempla as características citadas, e aplicações em diversas matrizes.

Um método analítico exato e utilizando membrana líquida renovável suportada por membrana oca de polipropileno (HFRLM) e detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) foi desenvolvida para determinação de cinco sulfonamidas em amostras de mel. Limites de detecção na faixa de 5,1 a 27,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e coeficientes de correlação superiores a 0,99 foram obtidos para todos os compostos analisados. Os resultados obtidos para o método proposto mostram que HFRLM-LC-ESI-MS/MS pode ser usado na determinação das cinco sulfonamidas em amostras de mel estudadas com adequada precisão, exatidão e praticidade.

Um procedimento envolvendo o desempenho simultâneo da microextração líquido-líquido e membrana microporosa de polipropileno como fase sólida (LLME-MMSPE) é apresentado para extração de agrotóxicos. A aplicabilidade do método desenvolvido foi avaliada através da extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de água de rio, tomate e morango. Limites de detecção na faixa de 2,7 a 13,7 ng L^{-1} , 1,69 a 3,85 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 0,46 a 12,77 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram obtidos para amostras de águas de

rio, morango e tomate, respectivamente. Boas repetibilidades foram obtidas para as três amostras. Os resultados obtidos indicam que o método proposto utilizando a microextração pode ser uma alternativa de baixo custo e elevada simplicidade com limites quantificação adequados para determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras ambientais e alimentícias.

Um método baseado no uso de extração líquido-líquido e membrana oca microporosa (HF-MMLLE) com detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série foi desenvolvido e aplicado. A aplicabilidade do método foi avaliada a partir da extração simultânea de dezoito agrotóxicos pertencentes a diferentes classes como organofosforados polares, carbamatos, neonicotinoides, amidas, pirimidinas, benzimidazóis e triazóis em sucos industrializados e frescos. Limites de detecção na faixa de 0,003–0,33 mg L⁻¹, 0,003–0,35 mg L⁻¹ e 0,003–0,15 mg L⁻¹ foram obtidos para as amostras de suco de laranja industrializado normal, light e suco fresco, respectivamente. Boa repetibilidade foi obtida para as três amostras. O método foi aplicado para cinco diferentes amostras de suco de laranja: contendo extrato de soja, polpa de laranja, néctar, suco light e suco fresco. Os resultados apontaram que o método proposto pode ser aplicado para determinação de agrotóxicos de múltiplas classes nas amostras descritas com limites de detecção e quantificação adequados.

Portanto, metodologias de preparo de amostras utilizando microextração em fase líquida suportada por membrana microporosa de polipropileno apresentam-se como uma alternativa viável, com limites de quantificação abaixo dos LMR e baixo custo para análises de contaminantes orgânicos em amostras ambientais e alimentícias.

Palavras-chave: membrana microporosa de polipropileno, microextração em fase líquida, HFRLM, HF-LLME, LLME-

MMSPE, agrotóxicos, sulfonamidas, mel, tomate, morango, laranja e águas de rio.

ABSTRACT

The need for more analysis of several contaminants in various matrices and the development of new analytical technologies require the development and improvement of analytical techniques since the sample preparation until its final analysis. These new methods are based on concepts that involve minimal solvent consumption, simplicity and shorter analysis time maintaining the characteristics of precision and accuracy as well as high detectability. In this context, this study shows the use of microporous polypropylene membrane as support for developing methodologies using liquid phase microextraction which include the features mentioned above. The developed methodologies were applied in various matrices and are described below. A sensitive and precise analysis using hollow fiber renewal liquid membrane (HFRLM) followed by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is described for determination of five sulfonamides in honey samples. Detection limits in the range of 5.1 to 27.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and coefficient of determination higher than 0.987 were obtained for the target analytes. The results obtained for the proposed method show that HFRLM-LC-MS/MS can be used for determination of the five sulfonamides studied in honey samples with excellent precision, accuracy, practicality and short time analysis. In addition, a procedure involving the simultaneous performance of liquid-liquid microextraction and polypropylene microporous membrane solid phase extraction was carried out. The applicability of the proposed procedure was evaluated through extraction of several organochlorine pesticides from river water, tomato and strawberry samples. Detection limits in the range of 2.7 to 13.7 ng L^{-1} , 1.69 to 3.85 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and 0.46 to 12.77 $\mu\text{g kg}^{-1}$

were obtained for river water, strawberry and tomato samples, respectively. Good repeatability was obtained for all three sample types. The results suggest that the proposed procedure represents a very simple and low-cost microextraction alternative rendering adequate limits of quantification for the determination of organochlorine pesticides in environmental and food samples. Finally, the procedure involving hollow fiber microporous liquid-liquid extraction (HF-MMLLE) and detection by LC-MS/MS was developed and applied. The applicability of proposed procedure was evaluate by simultaneously extraction of eighteen pesticides of multi class (polar organophosphates, carbamates, neonicotinoids, amides, pyrimidines, benzimidazoles and triazoles) in industrial and fresh orange juice. Detection limits in the range of 0,003–0.33 mg L⁻¹, 0.003–0.0,35 mg L⁻¹ and 0.003–0.15 mg L⁻¹ were obtained for carton orange juice, carton orange juice light and fresh orange juice samples, respectively. Good repeatability was obtained for all three sample types. The method was applied in five different samples contain soybean extract, orange pulp, nectar, light juice and fresh orange juice. The results suggest that the proposed procedure represents a very simple and low-cost microextraction alternative rendering adequate limits of quantification for the determination of these pesticides in juice samples.

Therefore, techniques for sample preparation using liquid phase microextraction supported microporous polypropylene membrane is presented as a viable and low cost for analysis of organic contaminants in food and environmental samples.

Keywords: polypropylene microporous membrane, microextraction liquid phase, organochlorine pesticides, honey, sulfonamides, pesticides, tomate, orange juice, strawberry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de exemplos das diversas técnicas de extração..... 45

Figura 2. Esquema ilustrativo do princípio básico de extração por LPME. 56

Figura 3. Sistema de concentração (LPME). (A): Extração em fase líquida suportada por membrana oca, empregando configuração em “U”. (B): e do tipo “haste” (“rod-like”). 60

Figura 4 -. Estudo do pH da amostra. Condições experimentais: 300 μ L de 1-octanol, 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão no respectivo pH, 250 μ g/kg de padrão de cada sulfonamida e 0,5 g de amostra de mel orgânico. Fase receptora: 100 μ L de tampão carbonato em pH 10,0..... 88

Figura 5. Estudo do tampão da fase receptora. Condições experimentais: 300 μ L de 1-octanol, 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 μ g/kg de padrão de cada sulfonamida e 0,5 g de amostra de mel orgânico. Fase receptora: 100 μ L do respectivo tampão em pH 10,0.....89

Figura 6. Estudo para seleção do solvente de extração por HFRLM com membrana de polipropileno e determinação por LC-MS/MS. Condições experimentais: 300 μ L de solvente, 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 μ g/kg de padrão de cada sulfonamida e 0,5 g de amostra de mel orgânico. Fase receptora: 100 μ L de tampão carbonato em pH 10,0.....91

Figura 7. Estudo do efeito da massa de amostra e do volume de solvente na extração de sulfonamidas por HFRLM e determinação por LC-MS/MS. Condições experimentais: 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250

$\mu\text{g/kg}$ de padrão de cada sulfonamida. Fase receptora: 100 μL de tampão carbonato em pH 10,0. 93

Figura 8. Estudo do efeito da temperatura e do tempo na extração de sulfonamidas por HFRLM e determinação por LC-MS/MS. Condições experimentais: 300 μL de 1-octanol:pentanol (55:45 v/v), 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de padrão de cada sulfonamida e 0,625 g de amostra de mel orgânico. Fase receptora: 100 μL de tampão carbonato em pH 10,0. 95

Figura 9. A) Cromatogramas de um branco de amostra após a extração por HFRLM e determinação por LC-MS/MS. B) Cromatogramas de uma amostra fortificada com 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de padrões de sulfonamidas. Eixo das abcissas é dado em tempo (min) e o eixo das ordenadas é dado em porcentagem de intensidade(%). Condições experimentais: 300 μL de 1-octanol:pentanol (55:45), 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de

tampão acetato pH 5,0 e 0,625 g de amostra de mel orgânico.

Fase receptora: 100 μL de tampão carbonato em pH 10,0.99

Figura 10. Superfície de resposta triangular obtida a partir da extração com os solventes: tolueno, 1-octanol e hexano. Condições experimentais: volume de amostra de 15 mL, temperatura de extração ambiente, tempo de extração 60 minutos e concentração da mistura de agrotóxicos $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ cada113

Figura 11. Superfícies de resposta construídas para otimização das variáveis massa de sal, tempo e temperatura a serem selecionadas para extração de uma mistura de agrotóxicos organoclorados. A) Estudo da temperatura e efeito da massa de sal. B) Estudo da temperatura e o efeito do tempo. C) Estudo da massa de sal e tempo de extração. Condições de extração: volume de amostra 15 mL, volume de 1-octanol 20 μL , concentração da mistura agrotóxicos $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, massa de

sal variando de 0 a 5 g, temperatura variando de 23 a 70 °C e tempo variando entre 20 a 60 minutos. 115

Figura 12. Efeito sobre o sinal analítico da adição de excesso de 1-octanol diretamente na amostra de morango na membrana. 1) α -BHC; 2) β -BHC; 3) -BHC; 4) Heptclor; 5) Aldrim; 6) Heptaclor epoxido; 7) Endosulfam I; 8) 4,4'-DDE; 9) Dieldrim; 10) Endrim; 11) Endosulfam II; 12) 4,4'-DDD; 13) 4,4'-DDT. Condições experimentais: volume de amostra líquida 15 mL, 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de extração 60 min, temperatura de extração de 59 °C, massa de NaCl 2,91 g e 1 g de massa de amostra. 119

Figura 13. Superfície de resposta mostrando a influência da adição de metanol e massa de amostra na extração de agrotóxicos em morango. Condições experimentais: volume de amostra líquida 15 mL, 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de extração de 60 minutos, temperatura de extração de 59 °C,

massa de NaCl 2,91 g, massa de amostra variando entre 0,250 g e 1,00 g, volume de metanol variando entre 0 e 200 μL126

Figura 14. Influência do pH sobre o sinal analítico para amostras de morango. 1) α -BHC; 2) β -BHC; 3) Δ -BHC; 4) Heptaclor; 5) Aldrin; 6) Heptaclor epóxido; 7) Endosulfam I; 8) 4,4'-DDE; 9) Dieldrin; 10) Endrin; 11) Endosulfam II; 12) 4,4'-DDD; 13) 4,4'-DDT; Condições experimentais: volume de amostra líquida 15 mL, 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de extração de 60 minutos, temperatura de extração de 59 °C, massa de NaCl 2,91 g e massa de amostra 1 g.....127

Figura 15. Influência do pH da amostra no sinal analítico para amostras de tomate. 1) α -BHC; 2) β -BHC; 3) Δ -BHC; 4) Heptaclor; 5) Aldrin; 6) Heptaclor epóxido; 7) Endosulfam I; 8) 4,4'-DDE; 9) Dieldrin; 10) Endrin; 11) Endosulfam II; 12) 4,4'-DDD; 13) 4,4'-DDT; Condições experimentais: volume de amostra líquida 15 mL, 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo

de extração de 60 minutos, temperatura de extração de 59 °C,
massa de NaCl 2,91 g e massa de amostra 1 g. 132

Figura 16. Superfície de resposta gerada no estudo do
volume e do pH da amostra sobre a eficiência de extração dos
agrotóxicos por HF-MMLLE. Condições experimentais: 4 g de
cloreto de sódio, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de
extração 30 min., temperatura ambiente, 150 μL de tolueno
para extração e 50 μL de metanol para dessorção. 148

Figura 17. Estudo do efeito da adição de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
sobre a eficiência de extração. Condições experimentais: 500
 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico, 9 mL de suco em pH 7, tempo de
extração 30 min., temperatura ambiente, 150 μL de tolueno
para extração e 50 μL de metanol para dessorção. 149

Figura 18. Superfície triangular obtida no estudo de
diferentes solventes e proporções usados para extração dos

agrotóxicos por HF-MMLLE. Condições experimentais: 4 g de sulfato de amônio, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico, 9 mL de suco em pH 7, tempo de extração 30 min, temperatura ambiente e 50 μL de metanol de solvente de dessorção.....154

Figura 19. Efeito de diferentes solventes usados para extração dos agrotóxicos por HF-MMLLE. Condições experimentais: 4 g de sulfato de amônio, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico, 9 mL de suco em pH 7, tempo de extração 30 min., temperatura ambiente, 150 μL de tolueno:acetato de etila (85:15 v/v) para extração e 50 μL de solvente de dessorção. .155

Figura 20. Superfície de resposta para otimização das variáveis volume do solvente de extração, tempo e da temperatura de extração. A) Efeito do volume do solvente de extração e temperatura sobre a eficiência de extração. B) Efeito do tempo e do volume de solvente de extração sobre a eficiência de extração. C) Efeito da temperatura e tempo de

extração sobre a eficiência de extração. Condições experimentais: volume de amostra 9 mL, volume do solvente de dessorção 50 µL (metanol:acetona 50:50 v/v), temperatura de extração de 25 a 70 °C, tempo de extração de 15 a 60 min e volume do solvente de extração de 0 a 400 µL (tolueno:acetato de etila 85:15 v/v). 157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos segundo o organismo que controlam ⁷.10

Tabela 2. Classificação dos agrotóxicos pelo grau de toxicidade (Organização Mundial da Saúde, 2004).10

Tabela 3. Classificação dos agrotóxicos segundo o grupo químico e seus exemplos.11

Tabela 4. Estrutura e aplicação para os organoclorados estudados.....16

Tabela 5. Estrutura, classe e grupo químico, pKa e o limite máximo de resíduo definido pela ANVISA para os agrotóxicos estudados ^{27,28}.22

Tabela 6. Classificação dos antibióticos.27

Tabela 7. Estrutura, pKa e LMR estabelecidos pela ANVISA para as sulfonamidas em estudo.	31
Tabela 8. Valores de pka, transições selecionadas e parâmetros instrumentais otimizados na determinação das sulfonamidas estudadas por LC-MS/MS.....	80
Tabela 9. Parâmetros de validação para determinação de sulfonamidas em amostra de mel.....	96
Tabela 10. Recuperação e precisão do método proposto..	97
Tabela 11. Análises das amostras comerciais de mel adquiridas no comércio de Campinas.....	100
Tabela 12. Faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, coeficiente de correlação e RSD obtidos na validação da metodologia para a extração de uma mistura de agrotóxicos organoclorados em água.....	120

Tabela 13. Concentração e recuperação da extração dos agrotóxicos aplicando a metodologia desenvolvida com determinação por GC-ECD em amostras de água do Rio Cubatão e Aranranguá.123

Tabela 14. Parâmetros analíticos obtidos para a amostra de morango para os agrotóxicos organoclorados utilizando LLME-MMSPE e determinação por GC-ECD.....129

Tabela 15. Parâmetros analíticos obtidos na validação do método, LLME-MMSPE-GC-ECD, para determinação de agrotóxicos clorados em tomate.133

Tabela 16. Transições selecionadas, parâmetros instrumentais ótimos e tempo de retenção para os agrotóxicos estudados.....144

Tabela 17. Parâmetros analíticos obtidos para o método proposto para determinação de agrotóxicos em suco de laranja

industrializado normal usando a membrana de polipropileno
no sistema de HF-MMLLE. 162

Tabela 18. Faixa linear, coeficiente de correlação,
recuperação e limite de detecção e de quantificação obtidos
para o método proposto para determinação de agrotóxicos em
suco de laranja industrializado *“light”* usando a membrana de
polipropileno no sistema de HF-MMLLE. 164

Tabela 19. Faixa linear, coeficiente de correlação,
recuperação e limite de detecção e de quantificação obtidos
para o método proposto para determinação de agrotóxicos em
suco de laranja fresco usando a membrana de polipropileno no
sistema de HF-MMLLE. 165

Tabela 20. Concentrações e recuperações obtidas para a
determinação de multirresíduos de agrotóxicos em sucos de
laranja comerciais utilizando o método proposto. 169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI – Ionização química a pressão atmosférica (Atmospheric pressure chemical ionization)
APPI – Fotoionização a pressão atmosférica (Atmospheric pressure photoionization)
BPA – Boas Práticas Agrícolas
CE – Eletroforese capilar (Capillary Electrophoresis)
CI – Ionização química (chemical ionization)
CID – Dissociação por colisão induzida (collision-induced dissociation)
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD – Detector por arranjo de diodo (diode array detector)
ECD – Detector por captura de elétrons (Electron capture detection)
EI – Impacto de elétrons (electro impact)
EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency)
ESI – ionização por eletronebulização (electrospray ionization)
EU - União Europeia (Europe Union)
FDA – Food and Drug Administration
FM – Fase móvel
GC - Cromatógrafo gasosa (gas chromatography)
HF-MMLLE – Extração líquido-líquido utilizando membrana oca microporosa (Hollow fiber microporous liquid-liquid extraction)
HFRLM – Microextração por membrana líquida renovável usando membrana oca/porosa (Hollow fiber renewable liquid membrane)
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography)
IB – Instituto Brasileiro
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA – Ingestão diária aceitável
LC – Cromatografia líquida (Liquid chromatography)
LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (liquid-chromatography-mass spectrometry)
LD - Limite de Detecção
LLE - Extração líquido-líquido (liquid-liquid extraction)
LLME – Microextração líquido-líquido (liquid-liquid microextraction)
LMR – Limite máximo de resíduo
LPME – Microextração em fase líquida (Liquid-phase microextraction)
LQ - Limite de Quantificação
MAE – Extração assistido por microondas (microwave assisted extraction)
MMLLE- extração líquido-líquido por membrana microporosa (liquid-liquid extraction microporous membrane)
MMSPE – Extração em fase sólida utilizando membrana microporosa (Microporous membrane solid-phase extraction)
MRM – monitoramento de reações múltiplas (monitoring multiple-reaction)
MS - Espectrometria de Massas (Mass Spectrometer)
MSR – monitoramento de reação selecionada (monitoring selection-reaction)
OMS – Organização mundial da saúde
PFE- Extração por fluido pressurizado (pressurized fluid extraction)
PNCR – Plano Nacional de Controle de Resíduos
Q-TOF – Analisador de massas quadrupolo acoplado ao tempo de voo (Quadrupole – Time-of-flight)
Q-Trap – Analisador de massas quadrupolo acoplado ao armazenamento de íons (Quadrupole- Ion Trap)
rpm - Unidade rotacional - Rotações Por Minuto
RSD - Desvio padrão relativo (relative standard deviation)
SD - Sulfadiazina

SDME - Microextração em gota única (single-drop microextraction)

SFE - Extração por fluido supercrítico (supercritic-fluid extraction)

SLM - Membrana líquida suportada (supported liquid membrane)

SM - Sulfamezarina

SMP - Sulfametoxipiridazina

SMX- Sulfametoxazol

SPE - Extração em fase sólida (solid phase extraction)

SPME - Microextração em fase sólida (solid phase microextraction)

ST - Sulfatiazol

USA - Estados Unidos da América (United States of America)

UV - Ultravioleta

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA	1
1.1 AGROTÓXICOS	7
1.2 ANTIBIÓTICOS.....	27
1.3 USO DE CROMATOGRAFIAS LÍQUIDA E GASOSA PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS	32
1.4 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	43
1.4.1 <i>Extração em fase sólida (SPE)</i>	47
1.4.2 <i>Microextração em fase sólida (SPME)</i>	48
1.4.3 <i>Extração líquido-líquido (LLE)</i>	49
1.4.4 <i>Extração assistida por membranas</i>	50
1.4.5 <i>Microextração em fase líquida (LPME)</i>	53
1.4.5.1 Princípios fundamentais em extrações com membranas	55
1.4.5.2 Fatores que influenciam no processo de extração por LPME.....	60
1.4.5.3 Recuperação, enriquecimento, velocidade de extração e seletividade	64

CAPÍTULO 2. OBJETIVO GERAL.....	69
--	-----------

CAPÍTULO 3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS EMPREGANDO TÉCNICAS ANALÍTICAS BASEADAS EM MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA SUPPORTADA POR MEMBRANA	70
--	-----------

3.1 NOVOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA SUPPORTADA POR MEMBRANA.....	71
--	----

3.1.1 <i>Microextração líquido-líquido por membrana líquida renovável suportada por membrana porosa de polipropileno</i>	<i>71</i>
--	-----------

3.1.2 <i>Microextração líquido-líquido combinado simultaneamente com extração em fase sólida por membrana porosa de polipropileno ..</i>	<i>73</i>
--	-----------

3.2 DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM MEL EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO POR MEMBRANA LÍQUIDA RENOVÁVEL SUPPORTADA POR MEMBRANA POROSA DE POLIPROPILENO (HFRLM) E LC-MS/MS	76
---	----

3.2.1 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>76</i>
---	-----------

3.2.2 <i>Breve introdução.....</i>	<i>76</i>
------------------------------------	-----------

3.2.3 <i>Parte experimental.....</i>	<i>79</i>
--------------------------------------	-----------

3.2.3.1 Instrumentação.....	79
3.2.3.2 Reagentes e padrões.....	81
3.2.3.3 Estratégias de otimização	82
3.2.3.4 Preparo de amostra otimizado	83
3.2.3.5 Validação.....	84
3.2.4 Resultados e discussão.....	86
3.2.4.1 Efeito do sal, pH da amostra e fase receptora.....	86
3.2.4.2 Efeito do solvente de extração.....	90
3.2.4.3 Efeito do volume do solvente de extração e da massa de amostra.....	91
3.2.4.4 Efeito do tempo e da temperatura de extração.....	93
3.2.4.5 Validação do método	96
3.2.4.6 Aplicação do método em amostras de mel.....	100
3.2.5 Conclusões parciais.....	101
3.3 ANÁLISE DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E FRUTAS POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COMBINADA SIMULTANEAMENTE COM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA POR MEMBRANA POROSA DE POLIPROPILENO E DETERMINAÇÃO POR GC-ECD E CONFIRMAÇÃO POR GC-MS	102

3.3.1	<i>Objetivos específicos</i>	102
3.3.2	<i>Breve introdução</i>	102
3.3.3	<i>Parte experimental</i>	104
3.3.3.1	Instrumentação	104
3.3.3.2	Reagentes e padrões	106
3.3.3.3	Procedimento de preparo das amostras	107
3.3.3.4	Extração simultânea por LLME e MMSPE	108
3.3.3.5	Estratégias de otimização	109
3.3.4	<i>Resultados e discussão</i>	110
3.3.4.1	Etapa de adsorção e dessorção.....	111
3.3.4.2	Efeito das condições de extração sobre a eficiência de extração	113
3.3.4.3	Comparação entre os procedimentos de LLME-MMSPE e MMLLE.....	118
3.3.4.4	Validação do método.....	120
3.3.4.5	Aplicação da metodologia de LLME-MMSPE-GC-ECD para extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de águas de rio	122

3.3.4.6 Aplicação da metodologia de LLME-MMSPE-GC-ECD para extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de morango e tomate.....	125
3.3.4.6.1 Otimização das condições para extração e concentração de agrotóxicos organoclorados em morangos.....	125
3.3.4.6.1.1 Validação e aplicação do método desenvolvido LLME-MMSPE para agrotóxicos organoclorados em morango	128
3.3.4.7 Otimização das condições para extração e concentração de agrotóxicos organoclorados em tomates	131
3.3.4.7.1 Validação e aplicação do método desenvolvido, LLME-MMSPE-GC-ECD, para determinação de agrotóxicos organoclorados em tomate	133
3.3.5 <i>Considerações parciais</i>	135
3.4 DETERMINAÇÃO MULTIRRESIDUAL DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE LARANJA INDUSTRIALIZADO E IN NATURA POR EXTRAÇÃO LÍQUID-LÍQUIDO UTILIZANDO MEMBRANA MICROPOROSA DE POLIPROPILENO (HF-MMLLE) E DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA – ELETRONEBULIZAÇÃO - ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE (LC-ESI-MS/MS)	136

3.4.1	<i>Objetivos específicos</i>	136
3.4.2	<i>Breve introdução</i>	136
3.4.3	<i>Parte experimental</i>	140
3.4.3.1	Reagentes e padrões	140
3.4.3.2	Procedimento de preparo de amostra.....	141
3.4.3.3	Instrumentação	143
3.4.3.4	Estratégias de otimização	146
3.4.4	<i>Resultados discussão</i>	147
3.4.4.1	Efeito do pH e do volume de amostra.....	147
3.4.4.2	Efeito do sal	148
3.4.4.3	Seleção do solvente de extração e dessorção	153
3.4.4.4	Efeito de volume de solvente de extração, tempo e temperatura de extração.....	156
3.4.4.5	Figuras de mérito e exatidão	160
3.4.4.6	Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de suco de laranja comercial industrializado e fresco.....	167
3.4.5	<i>Considerações parciais</i>	171

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES GERAIS.....172

4. CONCLUSÕES GERAIS.....173

Justificativa

A saúde humana assim como o controle e preservação ambiental são preocupações cada vez mais crescentes na sociedade em geral e também no âmbito acadêmico, sendo foco indiscutível nesse início de século. A contribuição das pesquisas que auxiliam, cada vez mais, os órgãos competentes a exercerem controles e monitoramentos, são de importância incalculável.

Desta forma, a realização de programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos é imprescindível para que ações de vigilância sanitária possam ser executadas, com foco na prevenção e controle dos riscos à saúde humana decorrentes do consumo de alimentos contaminados.

A partir de análises realizadas em alimentos é possível verificar a qualidade e a segurança dos alimentos consumidos pela população e, também, caracterizar as fontes de contaminação, proporcionando uma avaliação do uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos, além de fornecer subsídios para uma possível reavaliação dos agrotóxicos atualmente utilizados. O aparecimento desses resíduos de agrotóxicos em alimentos justifica-se pelo uso indiscriminado destes agrotóxicos devido à má prática agrícola, portanto deve-se estimular a adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA).

Entre os principais alimentos, que em pesquisas recentes aparecem no topo, apresentando níveis preocupantes de contaminação, estão as frutas e os legumes. Em se tratando de frutas, estas quando apresentam resíduos químicos acima dos limites estabelecidos pelo Codex Alimentarius FAO-OMS (FAO, 2002) ou a própria ANVISA, causam enormes prejuízos aos produtores, pois são proibidas de entrar em mercados externos. Além disto, não oferecem segurança alimentar aos consumidores internos e externos, que estão exigindo produtos livres de contaminantes.

Os níveis de resíduos de fungicidas, inseticidas e herbicidas, na cultura de morango, por exemplo, o qual apresenta elevados índices de contaminação, devem ser monitorados, com vistas a impedir a comercialização de frutos que apresentem níveis de resíduos acima dos limites estabelecidos, buscando atender as exigências fitossanitárias impostas pelos mercados consumidores.

Segundo pesquisa realizada pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, inicialmente a tendência era analisar todos os tipos de produtos (frutas e legumes), inclusive frutas exóticas ou não muito comercializadas. Porém, com base nos resultados obtidos, começou-se a priorizar aqueles que apresentavam maior incidência de resíduos. Entre as

frutas, destacam-se morango, goiaba, pêssego, figo, uva, laranja e maçã. Já entre os legumes, foram priorizados tomate, pimentão, alface, cenoura, vagem e brócolis.

Além dos agrotóxicos permitidos e específicos para cada cultura, há uma preocupação crescente quanto aos agrotóxicos utilizados de maneira incorreta sendo aplicado a uma cultura diferente para aquelas para qual foi originalmente destinado. Isso implica numa contaminação ainda mais problemática dos alimentos, desta forma há a necessidade de desenvolvimento de metodologias que compreendam também esse requisito, ou seja, permita a análise simultânea de agrotóxicos de diferentes classes.

O Grupo do Mercado Comum, integrado pelos países do Mercosul (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai), adota como referência, para o comércio intra-regional dos produtos agropecuários alimentícios in natura, os limites máximos de resíduos de agrotóxicos estabelecidos pelo Codex Alimentarius. Desta maneira, as novas metodologias desenvolvidas de análise devem, de toda forma, apresentar limites de detecção e quantificação capazes de atender os limites estabelecidos pelas agências que regem esse mercado. Nos países europeus o conselho da união européia e nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental-EPA (do inglês, Environmental Protection Agency) normatizam os limites máximos de resíduos permitidos.

A necessidade do aumento de produção de alimentos tornou o uso de agrotóxicos, como mencionado, uma prática corriqueira, porém, não somente produtos de origem vegetal tiveram sua produção afetada, outros produtos agropecuários também tiveram que adaptar sua produção às novas demandas e a estes também se estende a necessidade de um controle de qualidade adequado para que estejam em conformidade com a legislação vigente e não apresentem risco à saúde do consumidor. Entre esses produtos pode-se citar o mel. Os antibióticos usualmente aplicados na apicultura para controle da Loque americana (*Paenibacillus larvae*, subsp. *larvae*) e europeia (*Melissococcus plutonis*) são as tetraciclina e as sulfonamidas. O seu monitoramento eleva-se a nível da saúde pública, devido a possibilidade de desenvolvimento de reações tóxicas ou alérgicas em indivíduos susceptíveis. Além do risco toxicológico, a contínua exposição do indivíduo aos resíduos de antibióticos pode gerar um aumento da resistência às bactérias, quer pela transferência de bactérias resistentes ao homem por via da alimentação, provenientes de animais tratados com antibióticos ou animais infectados pela bactéria resistente, quer pela transferência do fator de resistência (fator-R) de bactérias não patogênicas resistentes a outras bactérias. Baseado no conceito de Segurança Alimentar e visando garantir um nível elevado de

proteção da saúde humana, tem-se um conjunto de recomendações que assentam no princípio da abordagem global e integrada, isto é, da realização de análises por metodologias oficialmente estabelecidas ao longo de toda a cadeia alimentar da exploração agrícola até a mesa. Em alternativa aos métodos oficiais tem-se a proposta de desenvolvimento de novos métodos que aplicam os conceitos já padronizados, porém que apresentam vantagens de custo e detectabilidade, além de possibilidade de análise multirresidual.

Capítulo 1 - Introdução e Revisão Bibliográfica

1.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são compostos amplamente utilizados na agricultura e na pecuária para controle de pragas. A ampla utilização destes compostos em vários ambientes representa riscos à saúde do trabalhador e de toda sociedade. Todavia, estas populações apresentam níveis diferentes de exposição que tornam o risco de agravos à saúde maior ou menor. Existem trabalhadores e consumidores de determinados produtos que apresentam dupla (trabalho e ambiente) ou tripla (trabalho, ambiente e consumo) exposição. Embora toda a sociedade esteja exposta a ação dos agrotóxicos, em maior ou menor grau, os trabalhadores são os que mais sofrem os efeitos da dupla ou tripla exposição¹.

A Organização Mundial de Saúde (OMS-WHO, 1999), com base nos dados de que se produz cerca de dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano, estima-se que ocorra anualmente cerca de 3.000.000 intoxicações agudas, com 200.000 mortes. O Brasil é o maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo e responde pelo uso de 86% dos produtos na América Latina².

Define-se agrotóxico como sendo substâncias ou mistura de substâncias usadas para prevenir ou controlar uma peste

(doença de plantas, ervas daninhas, insetos, fungos, etc.) no crescimento das plantas, ou como desfolhante ou dessecante³.

Por causa da presença dos agrotóxicos nos alimentos, para cada princípio ativo é determinada uma ingestão diária aceitável (IDA), que é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico presente em cada tipo de alimento permitida para ser ingerida diariamente durante toda sua vida, e que parece não oferecer risco apreciável à saúde à luz dos conhecimentos atuais, e é expressa em mg de agrotóxico por kg de peso corpóreo (mg/kg)^{4,5}.

Baseados em dados toxicológicos e em estudos de consumo médio diário do alimento pelo homem realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 1999), no qual são determinados os componentes da cesta básica da população brasileira, foram estabelecidos os limites máximos de resíduo (LMR) de agrotóxicos permitidos nos alimentos.

Os LMR são estabelecidos após avaliação de estudos de campo conduzidos pelas indústrias de agrotóxicos. Nesses estudos, os agrotóxicos são aplicados em uma determinada cultura de acordo com as boas práticas agrícolas (BPA), sendo posteriormente determinados os níveis remanescentes nos alimentos.

Os LMR estabelecidos pelo Codex Alimentarius (2000) baseiam-se em práticas agrícolas internacionais e visam proteger e preservar a saúde humana, garantindo o comércio internacional de alimentos livres de barreiras com respeito ao parâmetro de resíduos. Entretanto, o nível de resíduos de agrotóxico em alimentos depende de fatores agrônômicos e climáticos, e muitos países estabelecem seus próprios limites baseados nas boas práticas agrícolas praticadas localmente^{4,6}.

Os agrotóxicos podem ser agrupados em diferentes classes de acordo com a utilização, a toxicidade e ainda a classificação química, que considera a presença de funções químicas ou de átomos específicos na sua estrutura. A classificação dos agrotóxicos quanto ao grupo de organismos que controlam divide-se em: acarecidas, avicidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, entre outros (Tabela 1) ⁷. A classificação quanto à toxicidade, segundo a Organização Mundial da Saúde é a mais recomendada e geralmente usada (Tabela 2). Ela baseia-se na toxicidade aguda oral e dérmica para ratos, sendo determinada através do valor de Dose Letal (LD₅₀) de um composto que é o valor estimado da dose necessária em mg kg⁻¹ de peso corpóreo que irá causar morte de 50% dos animais em experimentação.

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos segundo o organismo que controlam ⁷.

Grupo de Agrotóxicos	Peste controlada	Grupo de Agrotóxicos	Peste controlada
Acaricidas	Ácaros	Inseticidas	Insetos
Avicidas	Aves	Larvicidas	Larvas
Bactericidas	Bactérias	Molusquicidas	Moluscos
Carrapaticidas	Carrapatos	Nematicidas	Vermes
Columbicidas	Pombos	Piolhidas	Piolhos
Cupinidas	Cupins	Pisticidas	Peixe
Formicidas	Formigas	Predacidas	Vertebrados
Fungicidas	Fungos	Purguicidas	Pulgas
Herbicidas	Ervas daninhas	Raticidas	Roedores

Tabela 2. Classificação dos agrotóxicos pelo grau de toxicidade (Organização Mundial da Saúde, 2004).

Classe	LD ₅₀ para ratos (mg/kg peso corpóreo)			
	Oral		Dérmico	
	Sólidos ¹	Líquidos ¹	Sólidos ¹	Líquidos ¹
Ia - Extremadamente perigoso	5 ou menos	20 ou menos	10 ou menos	40 ou menos
Ib - Altamente perigoso	5 - 50	20 - 200	10 - 100	40 - 400
II - Moderadamente perigoso	50 - 500	200 - 2000	100 - 1000	400 - 4000
III - Levemente perigoso	Maior que 500	Maior que 2000	Maior que 1000	Maior que 4000

¹ Os termos “sólidos” e “líquidos” se refere ao estado físico do ingrediente ativo, classificado.

De acordo com o grupo químico, como citado anteriormente, pode-se classificar os agrotóxicos como mostrado na Tabela 3⁸.

Tabela 3. Classificação dos agrotóxicos segundo o grupo químico e seus exemplos.

Grupo Químico	Exemplos
Inseticida	
Hidrocarbonetos clorados	aldrim, clorodane, heptacloro, toxafane
Organofosforados	diazinona, dissolfaton, parationa, malationa
Carbamatos	carbaril, carbofurano, metomila
Pireto	piretrim
Fungicidas	
Tiocarbamatos	ferbam
Mercuriais	ceresan
Herbicidas	
Ácidos fenoxialquílicos	2,4-D, 2,4,5-T, MPCA
Triazinas	atrazina, simazina, propazina
Feniluréias	diurom, linurom, fluometurano
Ácidos alifáticos	dalapona
Dinitroanilinas	trifluralim, benefin
Dipiridilas	paraquati, diaquati
Amidos	alacloro, propacloro, propanil
Benzóicos	amiben, dicambra

Os agrotóxicos organoclorados são de interesse especial, devido a sua elevada estabilidade química, o que resulta na sua persistência e bioacumulação no ambiente e em tecidos animais,

aumentando os riscos à saúde humana já que os mesmos podem ser causadores de doenças como câncer e ainda desregulador de funções hormonais.

Assim, muitos compostos organoclorados, oriundos tanto de fontes agrícolas como industriais, apresentam, frequentemente, alta resistência à degradação química e biológica e alta solubilidade em lipídios. A combinação entre a baixa solubilidade em água e a alta capacidade de sorção na matéria orgânica leva ao acúmulo desses compostos ao longo da cadeia alimentar, especialmente nos tecidos ricos em gorduras dos organismos vivos. O BHC (hexaclorocicloexano) é um exemplo de organoclorado que, apesar de ser classificado como de persistência intermediária, é bastante estável à ação da luz, do calor, do ar e de ácidos fortes, sendo capaz de permanecer no solo, sem se decompor totalmente, por cerca de cinco anos.

Os processos de transformação e de degradação dos agrotóxicos no solo dependem tanto das características do próprio solo como das características físico-químicas das substâncias. Moléculas de alta massa molar, contendo halogênios e/ou anéis aromáticos condensados, como os organoclorados, são mais persistentes. Os solos argilosos, por exemplo, com alto teor de matéria orgânica, tendem a reter resíduos por maior tempo, facilitando, assim, a persistência dos agrotóxicos ⁹.

Existem, também, evidências de que consideráveis quantidades de agrotóxicos atingem o mar. Segundo a Academia de Ciências dos Estados Unidos, cerca de 25% da produção mundial de organoclorados chega a este ecossistema. Sabe-se que a principal rota de entrada dos organoclorados no oceano, como o DDT (diclorodifeniltricloroetano) e aldrim, é a atmosfera. Estimativas têm indicado que a poeira transportada pelos ventos apresenta até 150 mg de DDT g⁻¹, enquanto as demais fontes possíveis de contaminação do oceano, no total, contribuem com apenas 1 mg de DDT g⁻¹. Há, porém, evidências de que quantidades maiores estejam entrando na cadeia alimentar dos oceanos ⁹.

Os rios, sendo o destino dos produtos de lixiviação de plantações e do próprio solo, apresentam grande potencial de contaminação, necessitando, desta forma, de constante monitoramento, já que os mesmos são utilizados como fontes de abastecimentos de água para a população. A União Européia estabelece limites de aproximadamente 0,1 µg L⁻¹ para agrotóxicos individuais e 0,5 µg L⁻¹ para soma de agrotóxicos em água doce ¹⁰.

No Brasil, a regulamentação é feita pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA (Resolução CONAMA 357/2005) e pelo Ministério da Saúde (Portaria do Ministério da

Saúde nº 518/2004) que determina quantidades específicas para cada composto.

Vários tipos de resíduos de agrotóxicos empregados para a produção, conservação e armazenamento de alimentos são frequentemente encontrados pelos programas de monitoramento nos mais diversos tipos de culturas. Alguns destes agrotóxicos são encontrados com limites máximos de resíduos acima dos estabelecidos pela vigilância sanitária, e muitas vezes, mais de um tipo de resíduo em um único alimento. Observa-se a partir dos resultados do programa de monitoramento conduzidos em nível nacional (ANVISA, 2002) que em algumas culturas, tem-se a presença de resíduos ativos que já foram completamente banidos para uso, devido à alta toxicidade, como é o caso do endossulfam, muito encontrado em morangos ^{11,12,13} .

Os agrotóxicos clorados podem ser introduzidos no organismo através das vias cutânea, digestiva e respiratória. A eficiência da absorção dermal é variável. Os hexaclorocicloexanos(BHC), incluindo o lindano e ciclodienos, como aldrim, dieldrin, endrin e endossulfam, são eficientemente absorvidos quando em contato com a pele. No entanto, a maior introdução no organismo de compostos, como o DDT e dicofol, ocorre através dos alimentos, principalmente os que contêm elevada quantidade de gordura. Além dos alimentos, a absorção

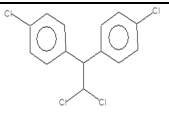
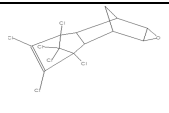
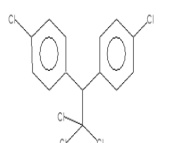
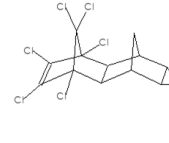
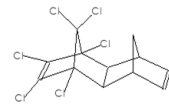
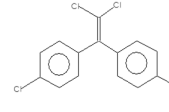
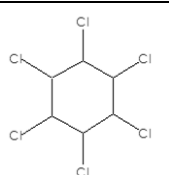
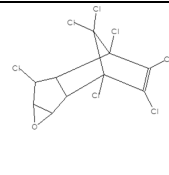
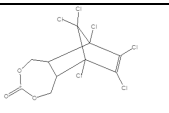
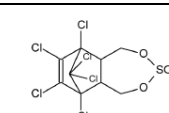
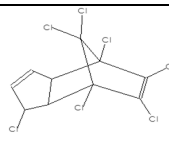
dos agrotóxicos pode ocorrer por meio da via respiratória, que absorve as partículas de poeira presentes no ar ⁹.

No organismo humano, os organoclorados atuam basicamente no sistema nervoso central e no sistema de defesa do organismo. Os organoclorados causam sérias lesões hepáticas e renais. Alguns produtos desse grupo lesam o cérebro, outros os músculos do coração, a medula óssea, o córtex da supra-renal, o DNA etc. A atividade estrogênica pode ser afetada estimulando a testosterona e propiciando a puberdade precoce, conforme foi comprovado para o DDT. Alguns estudos têm evidenciado a atividade imunossupressora de certos compostos desse grupo e as alterações na conduta dos indivíduos. Casos de câncer em órgãos do aparelho digestivo, pulmão e rim foram registrados em pessoas contaminadas com BHC.

Estudos, realizados na Califórnia, indicaram que mulheres com altos níveis de DDE no corpo, possuem um risco quatro vezes maior de contrair câncer de mama ⁹.

Os organoclorados que foram determinados neste trabalho de tese, nas matrizes de água de rio, tomate e morango estão apresentados na Tabela 4. Como o uso dos organoclorados foi proibido no Brasil, não há na ANVISA, os LMR estabelecidos para esses compostos.

Tabela 4. Estrutura e aplicação para os organoclorados estudados.

Composto	Estrutura	Composto	Estrutura	Aplicação
4,4'- DDD		Dieldrin		inseticida
4,4'- DDT		Endrin		inseticida
Aldrin		4,4'-DDE		inseticida
BHC		Heptaclor epóxido		inseticida
Endosulfam II		Endosulfam I		inseticida- acaricida
Heptaclor				

Na agricultura brasileira, uma vasta diversidade de agrotóxicos é utilizada, além dos organoclorados já descritos, ainda tem-se os organofosforados, carbamatos, triazinas, uracilas,

benzimidazol, triazol, feniltiouréia e neonicotinóides que são aplicados principalmente em cultura de citrus. Segue uma breve descrição destas classes de agrotóxicos.

Os organofosforados e os carbamatos constituem uma classe importante de inseticidas, fungicidas e parasiticidas usados, desde a segunda guerra mundial até os dias de hoje, no combate a diversos tipos de pragas na agricultura. A aplicação indiscriminada no campo tem originado graves problemas ao meio ambiente. Entre eles, ressalta-se a contaminação dos mananciais usados no abastecimento de água potável das cidades e a contaminação por resíduos que permanecem em frutas, como a laranja. Eles apresentam uma alta toxicidade, com valores DL_{50} variando entre 10-50 mg kg^{-1} e a sua ação tóxica no organismo se processa pela inibição da enzima colinesterase, com consequente acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas, o que impede a transmissão de novos impulsos, gerando uma série de efeitos no organismo tais como convulsões, paradas respiratórias e coma ¹⁴.

Em 1820, Lassaigne sintetizou o primeiro éster fosforado. Posteriormente, na Alemanha, o químico Michaelis evoluiu bastante a pesquisa destes compostos. Embora um grande número de organofosforados tenha sido descoberto no início do século, o conhecimento de seus efeitos deletérios só foi relatado em 1932, quando Lang e Kreuger observaram efeitos tóxicos em

ratos. A descoberta resultou em um grande número de novos usos potenciais para os compostos organofosforados, incluindo o seu uso como gases neurotóxicos, chamados de "gases dos nervos", os conhecidos gases de guerra sarin, soman e tabun, que foram usados na II Guerra Mundial.

As intoxicações por carbamatos e organofosforados são um importante problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, nos quais ocorrem os maiores índices de mortalidade relativa a estes produtos ¹⁵. Nestes países, há dificuldades técnicas para o manejo destes pacientes, que inclui dificuldade para a análise da quantidade e do tipo de agente, ou para a dosagem da atividade da enzima colinesterase, que é inibida nestes envenenamentos, e que nem sempre estão disponíveis na rotina clínica; além do suporte ventilatório, muitas vezes necessário, e que normalmente só é possível em grandes hospitais. Há, portanto, necessidade de regulamentação de uso e políticas de prevenção para evitar esse tipo de intoxicação ^{15,16,17}. Dentre os indivíduos expostos acidentalmente a estes produtos, estão os que manipulam estas substâncias nos seus ambientes de trabalho, aqueles que se expõem por falta de higiene, ou por contaminação direta de alimentos, ou por ingestão acidental. Existe ainda, a contaminação voluntária, como tentativa de suicídio ^{18,19} que é extremamente expressiva ^{18,19,20,21}. A toxicidade

destes produtos varia enormemente, sendo os de maior toxicidade usados como gases de guerra e na agricultura, os de toxicidade intermediária, como inseticidas para animais, e os de mais baixa toxicidade, podem ser usados como inseticidas domésticos ^{19,20,21}.

Os benzimidazóis constituem, possivelmente, o grupo mais importante de fungicidas sistêmicos utilizados comercialmente, incluindo os fungicidas benomyl, carbendazim, tiofanato metílico e tiabendazol. Destes, sabe-se que o tiabendazol, aplicado ao solo, é absorvido pelas raízes e translocado para o caule e folhas sem sofrer hidrólise, concentrando mais na raiz, em soja, e sendo menos translocável que o carbendazim e o benomil, em algodoeiro. Possui ação ovicida em ácaros, não permitindo a eclosão de ovos ²¹.

Um representante do grupo dos benzimidazóis é o carbendazim, cujo nome químico (IUPAC) é metil benzimidazol-2-ylcarbamato, que é um fungicida sistêmico com ação de proteção e curativa. Em muitos estudos, realizados em camundongos de ambos os sexos, a carcinogenicidade do carbendazim é observada pela presença de tumores. Carbendazim causa crescimento de células com má formação e anomalias em ratos com 7 a 16 dias de gestação, quando administrado em doses diárias acima de 10 mg/kg/dia. Não há

efeitos dominantes adversos no teste de mutação letal ou fetal em ratos e camundongos. Não há dados para avaliação da absorção humana, somente em animais, nos quais o carbendazim é absorvido via trato gastrointestinal. Ele pode fracamente ser absorvido por inalação e através de contato com a pele (IPCS, 2007). Ela é aplicada para o controle de doenças fúngicas nos cereais, frutas (cítricas, morangos, bananas, abacaxis, mangas, abacate, uvas e outras), vegetais, plantas ornamentais, café, algodão, arroz, fibra, feijão, cana-de-açúcar, amendoim, borracha, fumo, cogumelo e outros grãos ^{21,22,23,24} .

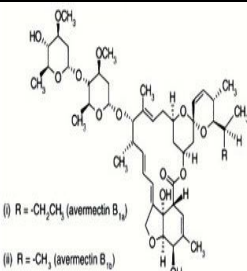
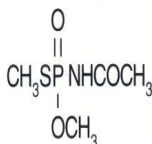
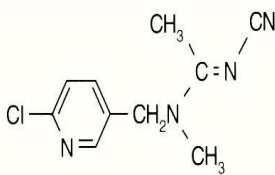
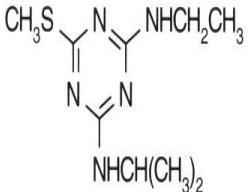
Outro grupo importante de herbicidas são as triazina. Uma das quais é a atrazina que, nos Estados Unidos, foi uma das que apresentou, nos últimos anos, o maior índice de venda. A descoberta das moléculas deste grupo químico ocorreu no início da década de 1950 pela empresa Geigy Química, de origem suíça. O uso comercial foi iniciado na década de 1960 e, desde então, a atrazina é o herbicida de maior uso mundial, devido ao extenso espectro de aplicação, principalmente no controle de folhas largas ²⁵ .

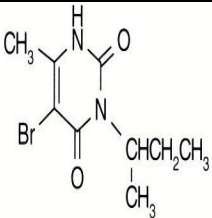
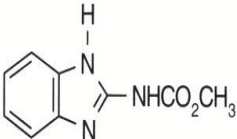
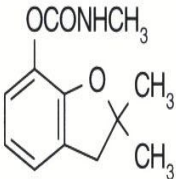
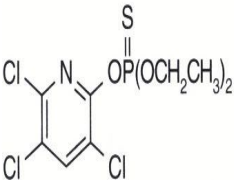
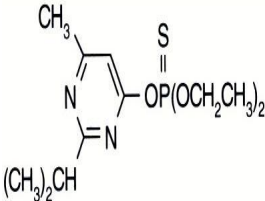
Os estudos abordando os herbicidas deste grupo têm importância devido à presença destes agrotóxicos em solos e águas de superfície, por suas características de alta persistência e

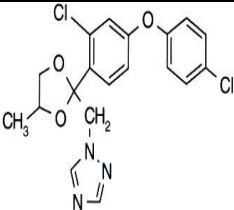
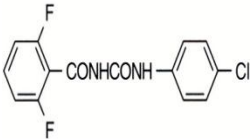
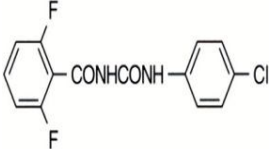
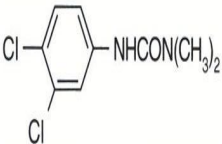
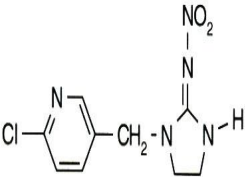
forte solubilidade, constituindo-se, assim, em grande preocupação ao meio ambiente ²⁶ .

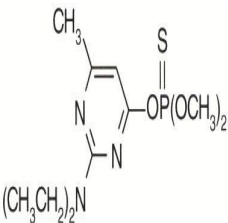
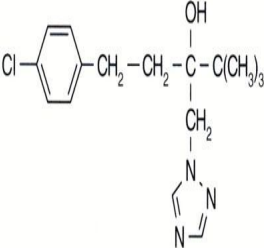
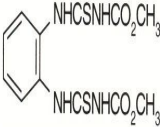
Atualmente, ainda não existem estudos sobre os efeitos tóxicos em seres humanos, sabe-se apenas do potencial carcinogênico dos agrotóxicos desse grupo. Os agrotóxicos listados na Tabela 5 estão entre os principais agrotóxicos utilizados na cultura de citrus, segundo a ANVISA ^{27,28} .

Tabela 5. Estrutura, classe e grupo químico, pKa e o limite máximo de resíduo definido pela ANVISA para os agrotóxicos estudados ^{27,28}.

Agrotóxico	Estrutura	Classe/grupo químico	pKa	LMR (mg kg ⁻¹)
Abamectina [Na ⁺]	 <p>(i) R = -CH₂CH₃ (avermectin B_{1a}) (ii) R = -CH₃ (avermectin B_{1b})</p>	Inseticida, Acaricida, Nematicida/ Biopesticida	Não aplicável	0,005
Acefato		Inseticida/ Organofosfato	8,35	0,5
Acetamiprido		Inseticida/ Neonicotinóide	0,7	0,5
Ametrina		Herbicida/ Triazina	10,07	0,02

Bromacila		Herbicida/ Uracila	9,27	0,1
Carbendazim		Fungicida, Metabólito/ Benzimidazóis	4,2	5
Carbofurano		Inseticida, Nematicida, Acaricida, Metabólito/ Carbamato	Não aplicável	0,05
Clorpirifós		Inseticida/ Organofosfato	Não aplicável	2
Diazinona		Inseticida, Acaricida, Repelente/ Organofosfato	2,6	0,7

Difenoconazol		Fungicida/ Triazol	1,1	0,5
Diflubenzurom		Inseticida/ Benzoiluréia	--	0,2
Diflubenzurom		Inseticida/ Benzoiluréia	--	0,2
Diurom		Herbicida/ Feniluréia	Não aplicável	0,1
Imidacloprido		Inseticida/ Neonicotinóide	Não aplicável	1

Malationa	$ \begin{array}{c} \text{S} \\ \\ (\text{CH}_3\text{O})_2\text{P} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CO}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CO}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_3 \end{array} $	Inseticida, Acaricida/ Organofosfato	Não Aplicável	4
Pirimifós-metil		Inseticida Acaricida/ Organofosfato	4,3	5
Tebuconazol		Fungicida/ Triazol	--	5
Tiofanato-metilico		Fungicida/ Benzimidazóis	7,28	5
Triclorfom	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Cl}_3\text{C} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{P}(\text{OCH}_3)_2 \\ \\ \text{OH} \end{array} $	Inseticida/ organofosfato	--	0,1

Neste trabalho, desenvolveu uma metodologia para determinação multirresidual destes agrotóxicos (Tabela 5) com múltiplas classes em suco de laranja.

1.2 Antibióticos

Antibióticos, de uma forma genérica, são definidos como sendo substâncias químicas produzidas por várias espécies de microorganismos (bactérias, fungos) que suprimem o crescimento de outros microorganismos e podem eventualmente matá-los. Os antibióticos diferem bastante em suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, espectro antimicrobiano e mecanismo de ação. Muitos foram extraídos a partir de microorganismos e posteriormente identificados quimicamente e outros foram sintetizados, ampliando o arsenal terapêutico. Os antibióticos podem ser classificados de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6. Classificação dos antibióticos.

Grupos	Exemplos
β -lactâmicos	Penicilinas e cefalosporinas
Anfenicóis	Cloranfenicol e análogos
Tetraciclinas	Tetraciclina, clortetraciclina
Polipeptídeos	Bacitracina
Macrolídicos	Eritromicina
Aminoglicosídeos	Estreptomicina, gentamicina
Rifamicinas	Rifampicina
Sulfonamidas	Sulfametazaxol

Os riscos à saúde do consumidor são representados, principalmente, pelo desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis (causadas principalmente pela classe dos β -lactâmicos), pelos efeitos tóxicos, por carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da flora intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores ²⁹.

Deve-se levar em consideração o risco para a saúde humana proveniente do uso de antibióticos em animais já que tanto o animal como a bactéria pode desenvolver resistência. Quando antibióticos são usados, a bactéria poderá desenvolver resistência tanto por mutação quanto por aquisição genética, ou ainda por ambos ³⁰.

Tanto para as novas substâncias ativas como para as já existentes, que são utilizadas em medicamentos veterinários para animais geradores de alimentos, exigem o estabelecimento de limites máximos de resíduo (LMR) nos termos do Regulamento do Conselho da Comunidade Européia (CCE) 2377 / 90, EPA, FDA nos USA e os Ministérios da Saúde e da Agricultura, ANVISA, no Brasil. Os LMR são baseados no conceito de IDA, mas são ajustados de acordo com o princípio ativo e as espécies-alvo, para que valores possam ser estabelecidos para os tecidos e também para os produtos de origem animal ³⁰.

Dentre os grupos de antibióticos, destacam-se as sulfonamidas, objeto de estudo no presente trabalho. As sulfas foram sintetizadas pela primeira vez em 1908 por Gelmo *et al.* como resultado da busca por novos azocorantes. Posteriormente, Hoerlein *et al.* descobriram que corantes contendo o grupamento sufanil apresentavam afinidades por proteínas da seda e da lã. Em 1913, baseados em estudos anteriores, Eisenberg descobriu que a crisoldina, um dos azocorantes estudados, possuía pronunciada ação bactericida. Após descobertas da liberação em vivo da sulfanilamida e da comprovada atividade bactericida, em 1930, a partir sulfanilamida foram sintetizadas inúmeras sulfas ^{31,32,33}.

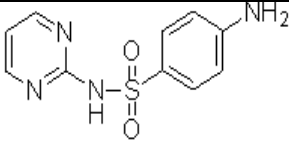
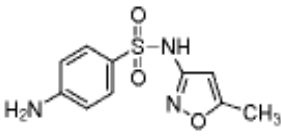
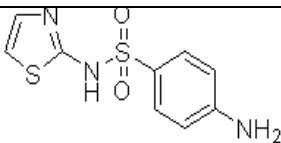
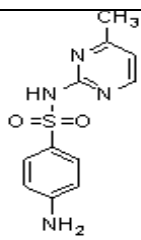
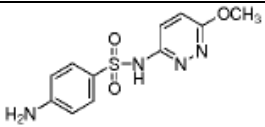
O mecanismo de ação das sulfas é conhecido. As sulfas interferem no crescimento bacteriano por afetarem a produção de FAH2 de duas maneiras: inibição enzimática e por formação de pseudo-metabólito, sendo a inibição enzimática o principal modo de ação. Pela interferência na produção normal de FAH2, a reprodução bactericida é encerrada e tem fim a multiplicação do microorganismo dentro do hospedeiro, mecanismo denominado como bacteristático a partir do conhecimento do mecanismo de ação das sulfas ³⁴.

As sulfas, como resultado das propriedades indutivas do grupamento SO₂, são compostos anfóteros, por possuírem

grupamentos químicos com caráter ácido e básico, o que permite que em determinadas faixas de pH estas moléculas se comportem como zwitteriônicas. A solubilidade e a atividade bacteriana são influenciadas pela constante de dissociação ácida das sulfas, sofrendo com alteração do pH do meio. Para fins fisiológicos, muitas sulfas podem ser administradas na forma de ácidos monobásicos, cuja forma não dissociada é fracamente solúvel, mas cujos sais básicos são altamente solúveis ³⁵.

Os antibióticos são usados na agricultura para inúmeros fins. Na apicultura esses antibióticos são usados no tratamento de abelhas para combater infecções associadas às doenças da Loque Americana e Loque Européia que atacam as suas larvas levando à destruição da colméia. As sulfonamidas são um dos grupos de antibióticos mais usados pelos apicultores. Destacando as que constam da Tabela 7.

Tabela 7. Estrutura, pKa e LMR estabelecidos pela ANVISA para as sulfonamidas em estudo.

Sulfonamida	Estrutura	pKa	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Sulfadiazina		6,50	100
Sulfametoxazol		5,81	--
Sulfatiazol		7,24	100
Sulfamerazina		6,98	--
Sulfametoxipiridazina		6,70	--

Devido a proibição, pela Legislação Européia, da comercialização do mel na presença de quaisquer resíduos de antibióticos, a ANVISA, seguindo estes preceitos determinou limites para a comercialização interna. Desta forma, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação destes resíduos figura-se como uma tarefa fundamental.

1.3 Uso de cromatografias líquida e gasosa para análise de resíduos de contaminantes em alimentos

A análise de resíduos orgânicos em alimentos emprega métodos cromatográficos baseados na cromatografia líquida e gasosa. Historicamente, a cromatografia gasosa (do inglês, gas chromatography - GC) foi à primeira técnica a ser empregada na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos devido ao elevado grau de desenvolvimento e especificidade de seus detectores ^{36,37}, como o detector por captura de elétrons ^{38,39}, de nitrogênio-fósforo ⁴⁰ e o fotométrico de chama ⁴¹. Na cromatografia gasosa, a amostra é introduzida em uma coluna capilar contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas adequadas no injetor de amostra, na coluna e no detector possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e da fase estacionária, são retidas por tempos

determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso do detector adequado ao final da coluna torna possível a detecção e quantificação dos compostos ⁴².

A cromatografia gasosa apresenta elevado poder de resolução, tornando possível a análise de dezenas de substâncias em uma mesma amostra. Além disso, oferece a possibilidade, quando acoplado ao detector apropriado para os analitos em questão, de obtenção de limites de detecção bastante baixos. Por essas características, a cromatografia gasosa é muito aplicada com finalidades quantitativas, sendo possível analisar compostos em concentrações que variam de picogramas a miligramas ⁴².

A obtenção de bons resultados tanto qualitativos, mas principalmente quantitativos, é extremamente dependente da relação entre os compostos a serem analisados e o detector empregado. Os detectores podem ser agrupados em duas classes, os universais e os seletivos. Detectores seletivos respondem a apenas uma classe de substâncias e têm maior detectabilidade que os universais. Um exemplo de detector seletivo é o detector por captura de elétrons que responde muito bem a compostos orgânicos halogenados, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos e é praticamente insensível a hidrocarbonetos, acetonas e alcoóis. A resposta seletiva a halogenetos faz com que seja particularmente útil na análise de agrotóxicos clorados.

A cromatografia gasosa pode ser acoplada a dois detectores que são considerados universais, o detector por condutividade térmica e a espectrometria de massas.

O acoplamento da técnica de cromatografia gasosa com a espectrometria de massas oferece vantagens muito atraentes já que a mesma permite, além da determinação quantitativa, a identificação, pois fornece informação estrutural dos compostos analisados. A combinação da cromatografia gasosa com o espectrômetro de massas é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade do alto vácuo do espectrômetro de massas ⁴³.

Os modos de ionização mais empregados no acoplamento da espectrometria de massas e cromatografia gasosa são a ionização por impacto de elétrons (do inglês, electron impact -EI) e a ionização química (do inglês, chemical ionization - CI). No processo de ionização por impacto de elétrons, o composto, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (70 eV). Ocorre principalmente a retirada ou captura de um elétron formando íons $M^{+\cdot}$ ou $M^{-\cdot}$, sendo os íons positivos predominantes. O excesso de energia interna adquirido pelo íon promove a fragmentação total ou parcial. A ionização por impacto de elétrons conquistou sua popularidade por produzir

tanto o íon molecular (massa) como também fragmentos (estrutura), espectros reprodutíveis, bibliotecas de espectros de EI a 70 eV, estável, facilidade de operação e excelente detectabilidade. A fragmentação excessiva ou demasiadamente rápida pode conduzir a não observação de íon molecular no espectro, perdendo-se, portanto, uma das mais importantes informações analíticas oferecidas pela espectrometria de massas, tornando-se um dos maiores problemas encontrado na aplicação de EI ^{42,43,44}.

Nos últimos anos, porém, tem aumentado significativamente o número de agrotóxicos registrados que possuem baixa estabilidade térmica, como por exemplo os carbamatos, o que inviabiliza o emprego direto da GC ou limita a sua aplicação ao uso de técnicas de derivatização do analito, que apresenta várias desvantagens.

A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, high performance liquid chromatography - HPLC) mostra-se uma técnica mais versátil, neste sentido, e têm sido desenvolvidos vários métodos de análise de contaminantes em alimentos que empregam a HPLC com detecção por absorção no UV-vis ⁴⁵, por fluorescência ⁴⁶ ou por arranjo de diodos (DAD) ⁴⁷. Resalta-se que a aplicação de HPLC com estes detectores requer que as amostras sejam relativamente limpas, uma vez que muitos dos

interferentes presentes na matriz absorvem na mesma região do UV em que absorvem o agrotóxicos ⁴⁸.

O acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas proporcionou a combinação das vantagens da técnica cromatográfica (alta seletividade e eficiência) com as vantagens da espectrometria de massas (informação estrutural, da massa molar e aumento da seletividade e detectabilidade), tornando possível a análise dos compostos independentemente da classe a qual pertence. Contudo, para que o acoplamento fosse possível, teve que vencer as incompatibilidades entre instrumentos e ainda o acoplamento não deve causar modificações químicas não controladas do analito e perdas de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas ⁴³. As incompatibilidades a serem vencidas neste acoplamento referem-se a presença de fase móvel líquida e sua vazão, que é relativamente elevada (cerca de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), ainda pode haver incompatibilidade quanto a composição da fase móvel e a dificuldade de análise de compostos com polaridades demasiadas elevadas. Também, há problemas com a velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Desta forma, não é possível o bombeamento direto do eluente para o espectrômetro de massas, assim, uma das mais importantes funções de uma interface

empregada em LC-MS é remover toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel (FM) ⁴³. Ainda, como os compostos analisados por LC são pouco voláteis e/ou sensíveis a temperatura o emprego das fontes de ionização comumente aplicadas a espectrometria de massas não podem ser utilizadas. Assim, novas interfaces e fontes de ionização foram desenvolvidas. Nas interfaces que foram desenvolvidas, muitas vezes é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis (massa molar elevada). Por esse motivo, algumas dessas interfaces são simplesmente chamadas de fontes de ionização. As fontes de ionização mais empregadas no acoplamento com a cromatografia líquida são ionização química a pressão atmosférica (do inglês, atmospheric pressure chemical ionization-APCI), fotoionização a pressão atmosférica (do inglês, atmospheric pressure photoionization-APPI) e ionização por eletronebulização (do inglês, electrospray ionization-ESI) ^{43,44}. Será dada maior ênfase a fonte de ionização por eletronebulização por ter sido a empregada nas análises realizadas nesse estudo.

Na ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido, no caso do acoplamento com LC, a fase móvel, passa através de um capilar, a pressão atmosférica,

mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas ("spray") que são dessolvatadas. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco, geralmente N_2 , na região do "spray". A medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento, ocorre a chamada "explosão coulômbica" que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que pela força da repulsão, os íons são ejetados das gotas. Os íons produzidos são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos (lentes) de focalização ^{43,44}.

O ESI pode ser utilizado na análise de vários tipos de compostos como os sensíveis a temperatura, sem que ocorra a degradação, uma vez que a ionização ocorre em solução. Os compostos que possuem massa molar elevada permitem a formação de íons com múltiplas cargas. O espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) dos íons, assim, o intervalo de massas que pode ser analisado utilizando o ESI se expande por um fator equivalente ao número de cargas do íon, isto é, íon com m/z 1000 e com 20 cargas representa um

composto com uma massa molar de 20 000 Da ⁴³. A ionização por ESI ocorre de maneira suave, ou seja, não há fragmentação significativa das moléculas, por isso são formados íons pseudo-moleculares intactos, no modo positivo $[M+H]^+$ ou no modo negativo $[M-H]^-$. O modo de operação positivo ou negativo é estabelecido a partir da fase móvel, na qual são adicionados modificadores específicos de acordo com o modo com o qual se deseja operar. No caso de modo positivo, pode ser adicionado a fase móvel um ácido, geralmente ácido fórmico. Já no modo negativo, adiciona-se à fase móvel um modificador orgânico, geralmente trietilamina ⁴⁹ ou acetato de amônio. Utilizando ESI, pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e os íons Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $HCOO^-$ e CH_3COO^- , isso pode ser controlado pela adição de modificadores na fase móvel que disponibilizem estas espécies iônicas ou no próprio solvente utilizado como fase móvel ⁴⁴.

A espectrometria de massas pode ser colocada em série, conhecida como LC-MS/MS quando acoplada a cromatografia líquida. Portanto, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas usando ESI ou APCI como fonte de ionização é uma poderosa ferramenta para análise de traços de agrotóxicos mais complexos, pois a detectabilidade é maior quando comparada a cromatografia líquida com detectores

convencionais e a seletividade é promovida pela seleção de íons fragmentos específicos. Uma desvantagem desses tipos de ionização é as fragmentações limitadas comparadas as obtidas com EI usada em CG-MS, porém isto pode ser superado pelo uso da espectrometria de massas em série.

O uso de espectrometria de massas em série também eleva a seletividade da análise, devido a possibilidade reduzida de haver outros íons precursor e íons produtos com a mesma razão m/z do composto a ser analisado. Ainda, MS/MS fornece confirmação inequívoca dos compostos. A confirmação positiva para amostras está baseada no número máximo de pontos de identificação (IPs) proposta pela European Commission Decision 2002/657/EC e “Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis”, SANCO No. 10232/2006⁵⁰.

Na espectrometria de massas em série, MS/MS, utiliza-se um analisador para isolar o íon com m/z proveniente da fonte de ionização (íon precursor) e o outro para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida (íon produtos). Esta técnica é amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, acoplada à cromatografia líquida, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de

compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter ^{43,44}.

Os analisadores de massas mais comumente empregados na MS-MS são o triplo quadrupolo, quadrupolo-analisador de tempo de voo ("time-of-flight") - QToF, "Ion-Trap" e quadrupolo-Ion-Trap (Qtrap) [16, 17]. Neste trabalho, foi utilizado um triplo quadrupolo, o qual é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons, mas como cela de colisão e como direcionador dos íons ao terceiro quadrupolo. Na cela de colisão ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID -collision-induced dissociation) ⁴³.

Na câmara de colisão, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar a sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto.

Em experimentos envolvendo espectrometria de massas em série podem ser utilizadas várias técnicas de varredura, tais como a varredura dos íons produto ("product-ion scan"),

varredura dos íons precursores (“precursor-ion scan”), varredura de perda constante de íons neutros (“constant-neutral-loss scan”) e o monitoramento seletivo de reação (“selected-reaction monitoring”). Em análises com o objetivo de quantificação, o mais indicado é o monitoramento seletivo de reação - MSR, no qual se realiza o monitoramento da fragmentação de um íon precursor selecionado no triplo quadrupolo por Q_1 e seus correspondentes íons produtos que após passarem pela câmara de colisão (q_2) chegam ao Q_3 . Porém, quando se trata do monitoramento da fragmentação de vários íons precursores (correspondentes a cada um dos compostos analisados), o modo de varredura empregado mais adequado é denominado de monitoramento de múltiplas reações (MRM -multiple-reaction monitoring), que foi utilizado nesse trabalho.

Quando se faz o acoplamento da cromatografia com a MS obtém-se o chamado cromatograma de massas que é assim denominado por se tratar de um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas ou apenas pelos íons de interesse produzidos por este.

Na literatura encontram-se, publicados recentemente, vários trabalhos em que a LC-MS/MS é empregada, junto à diferentes técnicas de preparo de amostras na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos ^{40, 51,52,53,54,55,56,57,58}.

A análise cromatográfica, isoladamente, é rápida podendo ser efetuada em minutos ou até mesmo em segundos. No entanto, na maioria das vezes há necessidade de etapas de preparo de amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferência e para evitar contaminação da coluna cromatográfica ⁴².

1.4 Técnicas de preparo de amostras

O interesse crescente em pesquisas relacionadas com o preparo de amostra tem sido gerado pela introdução de tecnologias diferentes das tradicionais, devido à necessidade de redução de volume de solventes, automatização, miniaturização, análise de compostos em concentrações cada vez mais reduzidas que requerem extratos o mais isentos possíveis de interferentes e com boas concentrações dos analitos de interesse. Ainda, ultimamente tem-se voltado à implementação de processos *on site*, *in situ* e *in vivo*.

O preparo da amostra é uma das etapas mais importantes em uma análise. Desta maneira, um preparo adequado deve contemplar alguns requisitos como simplicidade, rapidez, baixo consumo de reagentes e solventes e, em casos mais específicos, deve favorecer a concentração do composto de interesse e o

chamado "clean-up" que se destina a remoção do maior número possível de interferentes ⁵⁸. O processo analítico realizado na etapa de preparo de amostra consiste, comumente, de uma extração que resulta no isolamento e na concentração dos componentes de interesse da amostra. A extração pode variar em grau de seletividade, velocidade e conveniência, dependendo não somente da abordagem e condições usadas, mas também da configuração geométrica da fase extratora. A seguir serão descritas algumas técnicas de extração como a extração em fase sólida, extração líquido-líquido, microextração em fase sólida, extração assistida por membranas e microextração em fase líquida, dando-se maior ênfase para a técnica de microextração em fase líquida (LPME) na qual se baseia as técnicas empregadas no presente estudo.

A facilidade de operação é uma das características desejadas para essas extrações, que consistem em um desafio quanto à otimização, exigindo do químico analítico conhecimentos fundamentais não somente das condições de equilíbrio, mas também, e ainda mais importante, da cinética de transferência de massa presente no sistema de extração.

Há diversas técnicas de extração já conhecidas e aplicadas (Figura 1) oferecendo um leque abrangente quando se refere ao preparo de amostras. Estas técnicas oferecem inúmeras

possibilidades de desenvolvimento de metodologias com elevada praticidade e com limites de detecção e quantificação cada vez menores em relação as técnicas convencionais.

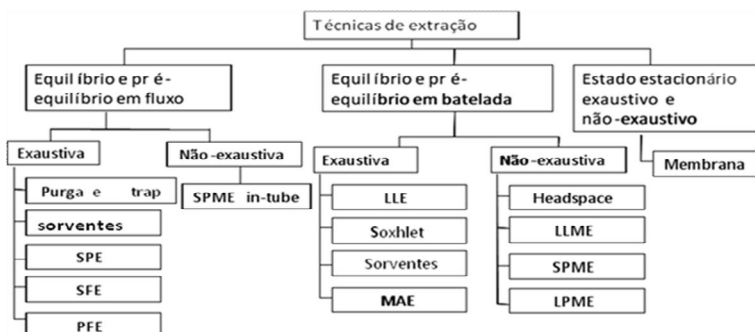


Figura 1. Esquema de exemplos das diversas técnicas de extração.

A classificação de técnicas de extração pode ser dada como exaustivas e não-exaustivas, sendo que, em princípio, a extração exaustiva não requer calibração, porque a maioria dos analitos é transferida para fase extratora pelo emprego de elevados volumes da mesma. Na prática, ocorre a confirmação acerca das recuperações obtidas pelo método pelo emprego de padrões internos, isto é, padrões internos são adicionados à amostra e desta forma passam pelas mesmas etapas que o analito em estudo, permitindo correções em relação ao efeito de matriz e injeção direta.

Para reduzir a quantidade de solvente e o tempo requerido para realizar a remoção exaustiva, técnicas de

equilíbrio em batelada (por exemplo, extração líquido-líquido) podem ser substituídas pela técnica de fluxo direto. Como exemplo, tem-se a técnica de SPE (extração em fase sólida) na qual, grandes volumes de amostras podem passar através de um pequeno cartucho e o fluxo direto aliado a um sorvente ou fase móvel adequada facilitam a eficiência na transferência de massa, resultando em uma concentração substancial do analito.

As técnicas não-exaustivas estão baseadas nos princípios de equilíbrio, pré-equilíbrio e permeação, fundamentalmente são análogas as técnicas de equilíbrio exaustivas, porém a capacidade da fase extratora é menor e geralmente insuficiente para remover a maior parte dos analitos da matriz. Isso se deve ao uso de pequenos volumes de solventes de extração em relação ao volume da amostra, nesse caso se estabelece um tempo de equilíbrio e a partir deste tem-se o tempo de extração. Geralmente, os tempos de extração para tais técnicas são pequenos.

O pré-equilíbrio é conceitualmente similar a análise de injeção em fluxo, na qual a quantificação é realizada num sistema dinâmico sendo desnecessário um sistema em equilíbrio para obtenção de níveis aceitáveis de detectabilidade, reprodutibilidade e exatidão.

Já em técnicas de permeação, por exemplo, extração por membranas, há um transporte contínuo de analitos através da fase extratora estacionária, devido a re-extração simultânea dos mesmos. A extração com membranas pode ser feita de forma não-exaustiva ou exaustiva a partir da confecção de módulos de membranas adequadas e ainda otimização das condições de fluxo.

Entretanto, existe uma semelhança fundamental entre todas as técnicas de extração usadas no processo de preparo de amostras. Em todas as técnicas, a fase extratora está em contato com a matriz da amostra e os analitos são transportados entre as fases. Assim, a termodinâmica do processo é definida pela constante de distribuição do analito (fase extratora / matriz amostra), sendo que os detalhes cinéticos dessa transferência do analito entre as fases tem influência profunda no tempo de análise. Uma explanação mais detalhada sobre a constante de distribuição será descrita dentro dos princípios de funcionamento da técnica de microextração em fase líquida.

1.4.1 Extração em fase sólida (SPE)

Na extração em fase sólida (do inglês, solid phase extraction), os mecanismos de retenção são idênticos aos

observadas em cromatografia líquida em coluna, podendo envolver interações polares, apolares e iônicas. Os cartuchos, na forma de barril ou seringa, são preenchidos com um material sorvente. A amostra é percolada através de uma fase sólida a qual retém o soluto de interesse que é posteriormente eluído por um solvente no qual o mesmo apresenta adequada afinidade/solubilidade. Apesar dessa técnica requerer um volume menor de solvente se comparada a extração líquido-líquido, ainda assim essa quantidade não pode ser considerada desprezível.

A retenção depende significativamente do composto a ser analisado e do sorvente. Uma desvantagem apresentada pela SPE é o alto custo do material. Entretanto, essa técnica encontra-se bastante divulgada, atualmente, na literatura ⁵⁹.

1.4.2. Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida, conhecida como SPME (do inglês, solid phase microextraction), consiste em uma peça de fibra ótica, composto de sílica fundida, que é recoberto por um sorvente ou um fino filme polimérico. A extração se baseia na afinidade do analito em relação ao recobrimento da fibra, sendo

este um fator determinante para o sucesso da técnica. O mecanismo está baseado no equilíbrio de partição, na qual as moléculas se deslocam na matriz e penetram no recobrimento da fibra, estabelecendo-se o equilíbrio.

A técnica de SPME pode ser utilizada de maneiras distintas, com ou sem contato direto com a matriz. Quando a fibra entra em contato com a matriz, denomina-se modo direto. A SPME direta é aplicada a amostras líquidas relativamente limpas. Quando a SPME é empregada na análise de amostras com alta ou média volatilidade, utiliza-se o modo indireto, no qual a fibra é exposta ao “headspace” da amostra que pode ser gasosa, líquida ou sólida.

Uma das desvantagens da SPME é a fragilidade da fibra, que resulta em tempo de uso reduzido. Esse fator é agravado devido ao alto custo do dispositivo. Outros problemas como efeito de memória têm sido relatados na literatura ⁵⁹.

1.4.3 Extração Líquido-Líquido (LLE)

A técnica de extração líquido-líquido (do inglês, liquid-liquid extraction - LLE) está baseada na partição da amostra entre duas fases imiscíveis. Para aplicação da técnica tem-se que

considerar a escolha adequada do solvente e o ajuste de pH, para que em condições ótimas, a recuperação do analito seja a mais elevada possível. O emprego desta técnica é relativamente simples.

As desvantagens trazidas pela técnica são o alto consumo de solventes, a possibilidade de formação de emulsões, e ainda, etapas de separação de fases que se torna uma dificuldade para automatização do processo ^{59,60}.

1.4.4 Extração assistida por membranas

A aplicação de processos de separação assistidos por membranas tem sido bastante estudada nos últimos anos, com destaque principalmente na aplicação em etapa de preparo de amostras.

Em termos gerais, a membrana pode ser uma barreira seletiva entre duas fases. A fase a partir da qual se transfere massa é chamada doadora e a fase que recebe é chamada receptora. As membranas sintéticas podem ser classificadas em quatro grupos: microporosas, homogêneas, trocadora de íons e assimétrica.

O processo de separação utilizando membranas está baseado nas diferentes taxas de transporte ou transferência das espécies químicas através da interface. Sendo assim, tem-se diferenciação entre três tipos básicos de transferência de massas conhecidos como: passivo, ativo e facilitado. O tipo passivo é mais comumente empregado em aplicações analíticas. Nesse caso, a membrana age como uma barreira através da qual os componentes são transportados sob a influência de um gradiente em seu potencial eletroquímico. Já no transporte facilitado, além da ação do gradiente, ainda está presente na membrana um carreador que aumenta a permeabilidade da mesma. O transporte do tipo ativo é geralmente encontrado em membranas celulares e é produzido contrariamente ao gradiente de potencial eletroquímico do composto, via uma reação que ocorre dentro da membrana ⁶¹.

De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), os processos de separação realizados baseados em diferenças de concentração são genericamente conhecidos como diálises, incluindo os processos nos quais ocorre a separação de gases, as diálises através de filmes porosos e os processos de extração. As membranas mais comumente usadas no processo de separação de gases são as do tipo homogêneas, poliméricas e líquidas, e em alguns casos,

membranas do tipo microporosas com poros extremamente pequenos.

Em processos de extração líquido-líquido, a transferência do analito ocorre através de duas fases imiscíveis. Quando membranas hidrofóbicas microporosas são usadas, estas agem como um suporte permitindo o contato entre a fase externa e a fase interna. Ao usar membranas homogêneas a separação do analito está diretamente relacionada com a taxa de transporte para a fase contida dentro da membrana, sendo desta forma, determinada pelo coeficiente de difusão e pela solubilidade na própria matriz da membrana. Membranas microporosas ou homogêneas são consideradas uma alternativa à metodologia tradicional^{61,62}.

As principais vantagens da utilização de membranas frente a extração líquido-líquido tradicional estão relacionadas a não formação de emulsões, a não necessidade da etapa de separação de fases e a alta razão superfície-área-volume.

Entre os campos de aplicação das membranas em química analítica, os métodos de separação que usam membranas como uma maneira elegante de resolver os problemas de preparo de amostras, apresentando ainda a vantagem de poderem ser automatizadas.

O grupo mais importante de membranas dentro das aplicações em química analítica, principalmente na área de extração, é o das membranas feitas a partir de polímeros e das membranas líquidas, especialmente das membranas líquidas suportadas. Em todos os casos, o processo de extração se dá em duas extrações consecutivas que envolvem a fase doadora e a membrana e a fase receptora e a membrana.

A principal vantagem da membrana líquida homogênea comparada a membrana polimérica é a velocidade rápida de transporte que estas proporcionam devido a difusão elevada das espécies em meio líquido. Além disso, à essas membranas podem ser facilmente incorporados carreadores que podem aumentar a seletividade e a permeabilidade da espécie de interesse. Uma vantagem atribuída a membrana polimérica é o seu tempo de vida útil longo, em comparação com as membranas líquidas que são suscetíveis a vazamentos de solventes, fato esse que pode vir a ser mais efetivo quando há aumento da polaridade dos mesmos^{61,62}.

1.4.5 Microextração em fase líquida (LPME)

A microextração em fase líquida (do inglês, liquid-phase microextraction - LPME) é uma miniaturização da técnica

tradicional de extração líquido-líquido e foi introduzida em meados de 1996 ⁶³. Inicialmente, representada por uma gotícula de solvente orgânico suspensa na extremidade de uma agulha de micro-seringa, a qual é exposta a uma amostra aquosa, permitindo a migração dos analitos com maior afinidade pelo solvente orgânico migrarem para a gota, procedendo, desta forma, uma microextração. Os fatores de enriquecimentos encontrados para analitos com altos coeficientes de partição são bastante significativos, porém a técnica apresenta deficiência quanto a robustez, já que a gota pode desprender facilmente da ponta da agulha, além de apresentar eventuais problemas que podem ocorrer quando se utiliza agitação vigorosa ⁶⁴. Desta forma, o emprego de membranas que podem agir como suporte para o solvente orgânico torna-se uma excelente alternativa ^{64,65,66,67}.

Pedersen-Bjergaard e Rasmussen introduziram recentemente um conceito alternativo para LPME baseado no uso de membrana oca feita de polipropileno que é simples, de baixo custo, facilmente disponível e, como característica mais importante, porosa ^{66,67}. O dispositivo para HF-LPME utilizando a membrana oca porosa apresenta-se como uma alternativa mais robusta e viável, pois, neste caso, o micro-extrato não entra em contato com a solução amostra, já que o mesmo está contido no

interior da membrana oca porosa. Essa característica permite que a agitação ou vibração da solução amostra em questão possa ser vigorosa, sem que ocorra perda do micro-extrato. Outra característica interessante deste dispositivo é a sua simplicidade e baixo custo, o que permite que se utilize a membrana uma única vez, evitando um possível efeito de memória.

1.4.5.1 Princípios fundamentais em extrações com membranas

O princípio fundamental da extração utilizando LPME está baseado, essencialmente, no coeficiente de partição entre os analitos e o solvente impregnado nos poros da membrana, sendo o processo de transferência dos analitos controlado pela difusão dos mesmos em solução. Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a geração de uma força motriz em solução para que a transferência de analitos seja efetiva, resultando numa concentração elevada.

A Figura 2 ilustra o processo básico de funcionamento de um dispositivo/sistema de LPME. Uma amostra aquosa contendo analitos de interesse é colocada em um pequeno frasco de vidro (normalmente âmbar) e um pedaço/segmento de membrana de polipropileno porosa é colocada em contato com a amostra. O

volume da amostra geralmente permanece em uma faixa de 0,1 – 20 mL, enquanto que o segmento de membrana esta entre 1 a 10 cm, dependendo basicamente do sistema ao qual será aplicado. As membranas apresentam as seguintes características: são membranas capilares com 600 μm de diâmetro interno, 200 μm de espessura de parede e 0,2 μm de tamanho de poros e aproximadamente 75% de porosidade.

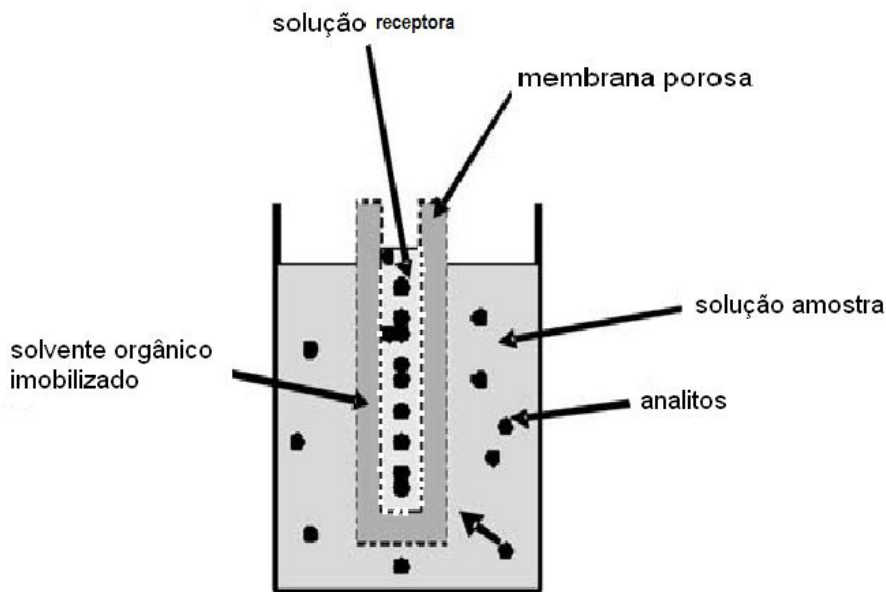


Figura 2. Esquema ilustrativo do princípio básico de extração por LPME.

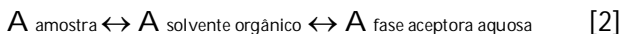
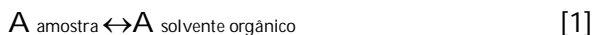
Devido à constituição porosa da membrana é possível impregnar solventes nos seus poros, os quais podem facilitar, sobremaneira, a extração de compostos orgânicos a partir da solução. Estes solventes orgânicos empregados devem apresentar características como ser imiscível em água, para que o mesmo permaneça nos poros durante o processo de extração e proporcionar um coeficiente de partição significativo para o analito entre a amostra aquosa e o próprio solvente. A espessura da parede da membrana é de cerca de 200 μm , sendo que o solvente orgânico forma uma fina camada dentro da parede da membrana, assim o volume total de solvente imobilizado, geralmente, permanece entre 15 e 20 μL ⁶⁶.

O volume de solvente empregado apresenta-se como uma vantagem da LPME em relação à extração líquido-líquido, já que a quantidade de solvente é muito pequena. Mesmo utilizando-se um solvente que apresente relativa toxicidade esse método pode ser considerado concordante com os princípios da química verde.

No processo de extração, quando os analitos em questão são ionizáveis, a força motriz do processo é dada pela diferença de potencial químico entre a solução da amostra e da solução receptora. Quando se tem um sistema com três fases, o mesmo apresenta dois coeficientes de partição que devem ser

considerados, o coeficiente de partição entre a fase doadora-solvente orgânico e solvente orgânico-fase receptora.

Os sistemas de LPME podem ser empregados em configurações diferentes, ou seja, operando com duas ou três fases, sendo denominados de extração líquido-líquido ou líquido-líquido-líquido, respectivamente. Em um sistema de duas fases (equação 1), a fase receptora pode ser o mesmo solvente imobilizado nos poros, sendo que essa configuração pode ser aplicada para a maioria dos analitos que apresentam solubilidade sensivelmente maior em solvente orgânico que em água. Devido à fase receptora ser um solvente orgânico este tipo de sistema é diretamente compatível com a técnica de cromatografia gasosa, entretanto a evaporação e a reconstituição da amostra em meio aquoso é necessária quando se deseja utilizar cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou eletroforese capilar (do inglês, capillary electrophoresis - CE). No sistema de três fases, a fase receptora constitui-se em uma segunda fase aquosa para qual os analitos são extraídos a partir da fina camada de solvente imobilizado na membrana. Para melhor ilustrar os equilíbrios apresentam-se as equações abaixo:



O sistema em três fases (equação 2) é apropriado, para analitos que apresentem funções ácidas ou básicas. Para extração de compostos básicos, o pH da fase doadora é ajustado para uma faixa alcalina afim de suprimir a solubilidade do analito neste meio, já o pH da fase receptora deverá estar ácido para promover a solubilização dos analitos nesta fase. O contrário se dá quando os analitos em questão são ácidos, sendo então o pH da amostra ajustado para faixa ácida, enquanto que o pH da fase receptora é básico. Devido a natureza aquosa da fase receptora, esse sistema é comumente empregado para análises utilizando HPLC e CE.

Por outro lado, compostos que estão ionizados não serão extraídos pela membrana devido à barreira proporcionada pelo solvente orgânico imobilizado nos poros. Os compostos neutros estarão nas três fases mas não serão concentrados. A taxa de extração de macromoléculas neutras será baixa, devido ao baixo coeficiente de difusão das mesmas e também as características da membrana, como tamanho de poro na ordem de $0,2\ \mu\text{m}$ ⁶⁷.

Em termos práticos, há duas configurações principais em que a HF-LPME (do inglês, hollow fiber microextraction liquid-phase) é empregada: A) configuração em “U”, utilizando duas microseringas conectadas à membrana e B) configuração em “haste”, na qual somente uma microseringa é utilizada para injetar e coletar a fase receptora.

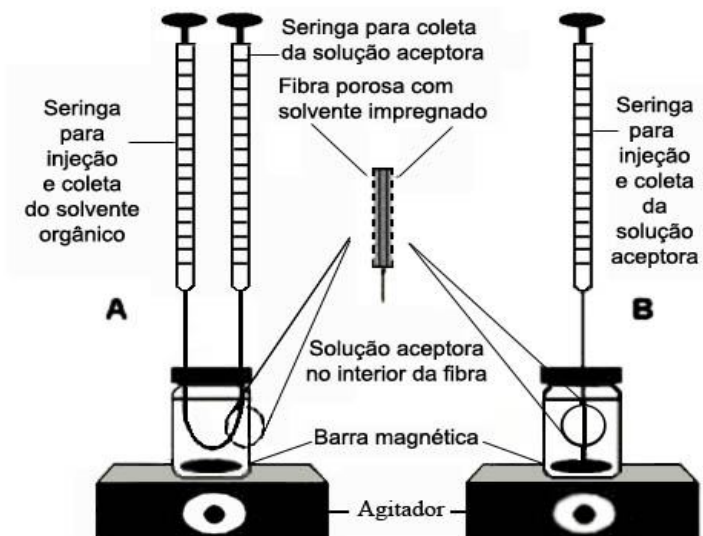


Figura 3. Sistema de concentração (LPME). (A): Extração em fase líquida suportada por membrana oca, empregando configuração em "U". (B): e do tipo "haste" ("rod-like").

1.4.5.2 Fatores que influenciam no processo de extração por LPME

Diversos fatores podem influenciar na técnica LPME, entre os quais estão a seleção do solvente orgânico, o pH da fase doadora e receptora, tempo e temperatura de extração e a variação da força iônica da fase doadora.

Variação da força iônica da fase doadora

A adição de sais à solução amostra provoca variação na força iônica do meio, sendo assim pode influenciar de maneira significativa no processo de extração. Em certos casos, o aumento da força iônica provoca redução da solubilidade do analito na matriz, devido ao efeito denominado “salting-out”. Neste processo, as moléculas de água hidratam os íons adicionados, ocorrendo à redução de moléculas do analito dissolvidos na solução aquosa por mecanismo de competição. Desta forma, aumentando-se a concentração de sal na fase doadora, as moléculas de água irão interagir preferencialmente com o sal, liberando o analito, para que este tenha uma maior interação com o solvente orgânico.

Seleção do solvente extrator

Um solvente apropriado para ser utilizado na técnica LPME deve apresentar algumas características peculiares como baixa solubilidade em água, baixa volatilidade, compatibilidade com a membrana e um coeficiente de partição significativo do analito em relação ao solvente ⁶⁸. Assim, para se obter tal

coeficiente o solvente deve apresentar polaridade semelhante a polaridade do analito em estudo.

pH da fase doadora e receptora

Em sistemas de LPME de duas fases o ajuste de pH se faz necessário apenas na solução doadora para que os compostos de interesse estejam na forma neutra, possibilitando assim uma interação significativa com o solvente extrator. Por outro lado, quando se tem um sistema de LPME de três fases, o ajuste do pH é necessário em ambas as soluções: doadora e receptora. Na solução doadora, o ajuste é feito com o mesmo objetivo do praticado em LPME de duas fases. Após a extração do analito pelo solvente extrator imobilizado nos poros da membrana, o analito é re-extraído pela solução receptora. Nesta etapa do processo é que se faz necessário o ajuste do pH da solução receptora para que o analito extraído permaneça na solução presente no interior da membrana, promovendo, desta forma, o enriquecimento desta fase. Esse sistema apresenta como característica relevante a possibilidade de ajuste para qualquer valor de pH, já que a membrana não sofre danos com pH extremos.

Agitação da solução doadora

Sendo processo é controlado por difusão sendo assim a agitação da amostra possui efeito significativo sobre a eficiência de extração. A agitação da amostra promove, por convecção, o deslocamento do analito do seio da solução até a camada hidrodinâmica, que neste caso é a membrana líquida que recobre a membrana porosa, onde ocorre o fenômeno de difusão que é a etapa lenta do processo. A agitação também possui efeito sobre a espessura da camada hidrodinâmica, quanto maior a agitação menor a espessura da camada hidrodinâmica.

Tempo e temperatura de extração

A eficiência da extração em LPME em duas ou três fases depende da transferência de massa do analito da fase doadora (aquosa) para a orgânica e desta para a fase receptora, quando se tem um sistema de três fases. Visto que a transferência de massa é um processo dependente do tempo, a influência do tempo de extração deve ser verificada. A temperatura também influencia diretamente na solubilidade do solvente extrator na amostra, uma das causas da degradação da membrana líquida e também na

viscosidade da amostra. A relação entre a difusividade e a temperatura é dada pela equação de Einstein-Stokes:

$$D = \frac{kT}{6\pi r\mu}$$

Onde: D é difusividade Browniana, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta em kelvin, r é o raio da molécula e μ é a viscosidade do meio.

Assim como em outras técnicas de microextração (ex: SPME), a LPME é um processo dependente do equilíbrio, normalmente necessitando de um período de exposição razoável para alcançá-lo ⁶⁸. Neste caso, a quantidade máxima a ser extraída será atingida quando o equilíbrio for alcançado.

1.4.5.3 Recuperação, enriquecimento, velocidade de extração e seletividade

Em um sistema de LPME duas fases, os analitos são extraídos pela difusão passiva da amostra aquosa (doadora) diretamente para o solvente orgânico que constitui a fase receptora. O processo depende do coeficiente de partição da fase

orgânica receptora e da solução doadora ($K_{a/d}$) que é definida pela equação 3.

$$K_{a/d} = C_{eq,a}/C_{eq,d} \quad [3]$$

onde: $C_{eq,a}$ é a concentração do analito em equilíbrio na fase receptora e $C_{eq,d}$ é a concentração do analito em equilíbrio na solução doadora.

Quando se tem um sistema de LPME em três fases, sendo um processo passivo, tem-se a extração dos analitos por difusão passiva da solução aquosa doadora através do solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana oca (fase orgânica) e posteriormente para o interior da fase receptora aquosa que se encontra no interior da membrana. O processo de extração, neste caso, é afetado por ambos coeficientes de partição, ou seja, entre a fase orgânica e a fase doadora ($K_{org/d}$) e entre a fase orgânica e a fase receptora ($K_{a/org}$).

$$K_{org/d} = C_{eq,org}/C_{eq,d} \quad [4]$$

$$K_{a/org} = C_{eq,a}/C_{eq,org} \quad [5]$$

onde $C_{eq,org}$ é a concentração do analito na fase orgânica, $C_{eq,d}$ é a concentração do analito em equilíbrio com a fase doadora aquosa e $C_{eq,a}$ é a concentração do analito em equilíbrio na fase receptora aquosa. O coeficiente de partição entre a fase receptora e doadora, o qual pode ser considerado como força motriz global

para o processo de extração pode ser calculado como o produto de $K_{org/d}$ e $K_{a/org}$.

$$K_{a/d} = C_{eq,a} / C_{eq,d} = K_{org/d} \times K_{a/org} \quad [6]$$

A recuperação (R) e o enriquecimento (E) em um sistema de duas fases podem ser calculados pelas equações:

$$R = (100 \times K_{a/d} \times V_a) / (K_{a/d} \times V_a \times V_d) \quad [7]$$

$$E = (V_d \times R) / (V_a \times 100) \quad [8]$$

onde V_a é o volume da solução receptora enquanto V_d é o volume da solução doadora.

Nos sistemas de três fases a recuperação pode ser calculada pela equação:

$$R = (100 \times K_{a/d} \times V_a) / (K_{a/d} \times V_a + K_{org/d} \times V_{org} + V_d) \quad [9]$$

onde V_a é o volume da fase receptora, V_{org} é o volume da fase orgânica imobilizada nos poros da membrana e V_d é o volume da fase doadora. O fator de enriquecimento para um sistema de LPME de três fases pode ser calculado da mesma maneira de um sistema de duas fases ⁶⁹.

A partir da equação 8, observa-se que tanto para sistemas de duas ou três fases, para se ter alto enriquecimento é necessário ter recuperação e a razão V_d/V_a elevadas.

Assim, se o volume da fase doadora for de 1 mL e o volume da fase receptora de 15 μ L, os analitos podem ser concentrados para um fator de 67. Este é um dos maiores

atrativos da LPME, especialmente para volumes relativamente pequenos de amostra, já que esta mesma concentração dificilmente seria obtida com as técnicas de SPE ou LLE.

Além da dependência do pH e da seleção do solvente orgânico, a recuperação em LPME é determinada pelo tempo de extração. Observa-se uma relação entre a recuperação obtida e o tempo de extração. O sistema de LPME entra em equilíbrio depois de um determinado tempo e a partir do estabelecimento deste, mesmo sob tempos prolongados de extração, não há ganho adicional na recuperação. Em muitos casos em LPME é utilizado um tempo de extração que chega muito próximo ao tempo de equilíbrio para maximizar a recuperação (tempos entre 35 a 60 min). Porém, recentes publicações afirmam que podem ser obtidos bons valores de repetibilidade e recuperação utilizando tempos menores, como de 10 min ^{69,70}. Sabe-se que a recuperação e a velocidade de extração são beneficiadas pela agitação.

Para que a LPME seja considerada uma alternativa versátil em relação às outras técnicas existentes é importante que ela apresente elevados índices de recuperação, de fator de concentração e de velocidade de extração. A velocidade de extração é um fator importante que é determinado pelo desenho do dispositivo de extração. Neste sentido, é crucial que a membrana possua a maior área de contato possível com a solução

doadora. Normalmente, a velocidade é controlada pela taxa de difusão, que por sua vez é afetada pela agitação. Outro fator que também afeta a velocidade de extração é a viscosidade da amostra, sendo que a mesma pode ser alterada com a temperatura e com a diluição da amostra. Em resumo, a velocidade é dependente da taxa de difusão. Logo fatores que possam afetar a difusão devem ser otimizados para obtenção de uma maior velocidade de difusão e, por consequência, uma velocidade de extração mais elevada.

A seletividade do sistema de LPME está relacionada principalmente com a ocorrência da extração reduzida de macro moléculas, devido ao tamanho dos poros da membrana. Além disso, as propriedades físico-químicas dos componentes da amostra podem ser usadas para que se obtenha a seletividade desejada e, como exemplo, pode-se citar o ajuste de pH do meio, que atuaria como fator determinante no "*clean-up*" fazendo com que apenas moléculas que se encontrem na forma não-ionizada sejam extraídas ⁶⁷.

Capítulo 2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver, validar e aplicar novos métodos analíticos baseados em microextração em fase líquida suportada por membranas para determinação de resíduos de contaminantes orgânicos em matrizes alimentícias e ambientais, utilizando a cromatografia líquida acoplada em série com a espectrometria de massas (LC-MS/MS) e a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD) como técnicas instrumentais.

**Capítulo 3. Desenvolvimento e validação de novos métodos
empregando técnicas analíticas baseadas em microextração em
fase líquida suportada por membrana**

3.1 Novos métodos propostos para microextração em fase líquida suportada por membrana

3.1.1 Microextração líquido-líquido por membrana líquida renovável suportada por membrana porosa de polipropileno

Esta metodologia é uma variação da LPME em três fases, na qual se utiliza o conceito de uma modificação do SLM (do inglês, supported liquid membrane) que foi introduzida por Rent *et al.* ^{71,72} e apresentada como membrana líquida renovável. Quando se utiliza a membrana porosa como suporte para a membrana líquida a técnica é denominada HFRLM (do inglês, hollow fiber renewal liquid membrane). Neste sistema o solvente orgânico extrator é introduzido diretamente na amostra, resultando em uma solução com elevada razão fase aquosa/solvente orgânico.

Devido à alta afinidade entre o solvente orgânico e a membrana hidrofóbica, uma fina camada de solvente é formada recobrendo a membrana porosa e resultando em uma membrana líquida na interface entre a fase doadora e a membrana.

A força de cisalhamento, devido à agitação da amostra, causa a formação de microgotas de solvente orgânico a partir da

camada superficial da membrana líquida. Essas microgotas de solvente orgânico presentes na solução possuem área superficial elevada, o que aumenta exponencialmente a área de contato entre o solvente extrator e a amostra, aumentando a eficiência de extração. Simultaneamente, essas microgotas são reintroduzidas no filme do solvente orgânico, renovando a membrana líquida. Esse processo eleva a taxa de transferência de massa, reduzindo significativamente a resistência da transferência de massa através da camada hidrodinâmica na interface fase doadora/membrana. Um volume extra de solvente orgânico é adicionado na fase doadora para garantir a renovação da camada líquida e para evitar a degradação da mesma pela perda de solvente orgânico por solubilização ou por formação de emulsão com a amostra ⁷³. O processo é, então, controlado pela difusão e pelo coeficiente de partição fase aquosa/solvente orgânico, respeitando o equilíbrio existente entre as três fases. A fase receptora possui papel essencial no deslocamento do equilíbrio, promovendo a concentração da mesma. Para isto, utilizam-se reações de complexação, no caso de metais, ou modificação do pH para compostos orgânicos ionizáveis.

Este princípio foi aplicado nas metodologias desenvolvidas no nosso grupo de pesquisa para isolamento e determinação de metais como Pb(II) e Cd(II) em amostras

ambientais ^{73,74} e para análise de antibióticos da classe sulfonamida em amostras de mel, que será descrita nesse trabalho.

3.1.2 Microextração líquido-líquido combinado simultaneamente com extração em fase sólida por membrana porosa de polipropileno

Uma nova configuração para HF-LPME, foi recentemente proposta por Zorita *et al.* ⁷⁵, denominada de extração líquido-líquido por membrana microporosa (do inglês, hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction – HF-MMLLE). Neste sistema, somente o solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana é usado como fase receptora, ou seja, uma extração não exaustiva. Depois da etapa de extração, o solvente orgânico na membrana é desorvido por um solvente adequado e então se realiza a análise instrumental. Esse método alternativo foi aplicado para determinar 4-isobutilacetofenona em água de rio e amostras de esgoto ⁷⁵.

Usando a mesma configuração e baseado no fato de que a membrana microporosa pode funcionar como adsorvente de analitos, Montes *et al.* ⁷⁶ descreve a aplicação da membrana porosa de polipropileno seca para a concentração de anisóis em matrizes aquosas. A eficiência de extração no modo direto e no

“headspace” nessa abordagem proposta é denominada extração em fase sólida por membrana microporosa (do inglês, microporous membrane solid-phase extraction – MMSPE).

Esta foi comparada a MMLLE, sendo que, em condições otimizadas, foram obtidos precisão, limites de quantificação e linearidade similares em ambas as técnicas. Baseado nesses conceitos, uma metodologia simples e de baixo custo foi desenvolvida aplicando simultaneamente microextração líquido-líquido (liquid-liquid microextraction – LLME) e MMSPE. Neste sistema, uma de membrana porosa de polipropileno de 1,5 cm, após ser lavada com acetona e seca, foi fixada numa haste cilíndrica inerte que se encontra presa no septo do frasco, esse dispositivo foi então colocado em contato direto com a amostra que continha o solvente orgânico. O sistema é fechado para evitar perdas do solvente para o meio, devido à elevação na temperatura do sistema. Após a extração, a membrana contendo o solvente concentrado com os analitos, permanece por um tempo determinado imersa em um solvente previamente selecionado para que ocorra a dessorção dos analitos. Na metodologia proposta, realizou-se um estudo comparativo entre a adição do solvente nos poros da membrana e diretamente na amostra. O volume de solvente utilizado, 20 μ L, corresponde ao volume que preenche os poros da membrana. Quando o solvente

é adicionado a amostra, ocorre uma maior interação do solvente com os analitos a serem extraídos, tornando a extração mais eficiente.

O procedimento proposto foi aplicado para a concentração de agrotóxicos organoclorados em amostras de água de rio, tomate e morangos (artigo em anexo).

Uma variação desta técnica foi aplicada no desenvolvimento de uma metodologia para determinação multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja. Neste procedimento proposto, permanece inalterada a parte que trata da membrana, a diferença é o volume de solvente extrator empregado, que foi estudado variando de 0 a 400 μL , sendo o mesmo adicionado diretamente na amostra. De acordo com os conceitos abordados anteriormente, esse volume adicional de solvente forma uma membrana líquida sobre a superfície da membrana de polipropileno, dando origem a membrana líquida renovável em sistema de duas fases. Desta forma, aplicam-se os mesmos princípios descritos para a membrana líquida renovável em um sistema de três fases.

3.2 Determinação de sulfonamidas em mel empregando microextração por membrana líquida renovável suportada por membrana porosa de polipropileno (HFRLM) e LC-MS/MS

3.2.1 Objetivos específicos

Determinar antibióticos da classe das sulfonamidas (sulfatiazol, sulfamerazina, sulfadiazina, sulfametoxipiridizina e sulfametoxazol) em amostras comerciais de mel orgânico e convencional empregando a técnica de microextração por membrana porosa de polipropileno (HFRLM) e identificação e quantificação por LC-MS/MS.

3.2.2 Breve introdução

De acordo com o Conselho Diretivo Europeu (2001/110/EC), mel é uma substância doce, natural, produzida por abelhas (*Apis Mellifera*) a partir do néctar de plantas, secreções de partes de plantas ou secreção de insetos que se alimentam de plantas. As abelhas coletam esse material e transformam o mesmo pela combinação deste material com substâncias específicas próprias. Depois, depositam, desidratam, armazenam e deixam em favos para amadurecer ⁷⁷. Quimicamente, mel é uma solução aquosa altamente higroscópica e com concentrações elevada de açúcares. Como amostra analítica, mel é uma matriz

muito complexa. A composição do mel depende muito da espécie de planta a partir da qual o néctar ou melato foi produzido, e ainda de outros fatores como condições ambientais e climáticas ⁷⁸.

Devido a sua rica composição, o mel apresenta apreciável valor para a saúde humana. Entretanto, esses benefícios podem ser reduzidos pela presença de toxinas, poluentes e contaminantes introduzidos durante a manipulação ou ainda provenientes do ambiente através da agricultura e/ou da apicultura. O mel pode ser contaminado de forma direta (com agrotóxicos, resíduos farmacológicos, acaricidas, repelentes de abelhas, substâncias usadas na proteção da madeira e outros resíduos provenientes das ceras de abelhas já utilizadas) ou de forma indireta (com agrotóxicos, bifenilas policloradas, bactérias, metais pesados, hidrocarbonetos poliaromáticos e radionuclídeos provenientes de práticas agrícolas ou do ambiente em geral) ⁷⁸.

Entre os contaminantes diretos estão os que pertencem a várias classes de medicamentos, nas quais os antibióticos, como as sulfonamidas, estão inclusos. As sulfonamidas, N-derivados do 4-amino-benzenosulfonamida, compreendem um grande grupo de compostos antibacterianos sintéticos. As sulfonamidas agem como promotoras do crescimento e são usadas em alimentação animal e ainda como drogas veterinárias para profilaxia e fins terapêuticos. A determinação de resíduos de

sulfonamidas em alimentos é importante, devido ao seu potencial carcinogênico e a possibilidade de desenvolvimento em seres humanos de resistência aos antibióticos ⁷⁹.

Neste contexto, com a crescente preocupação com a saúde humana, faz-se necessário a identificação e quantificação desses compostos em amostras de origem animal como leite, ovo, carne e mel. A análise de resíduos de antibióticos do grupo das sulfonamidas em mel é descrita na literatura utilizando técnicas já consolidadas como preparo de amostra por hidrólise e extração empregando extração em fase sólida (SPE), as quais envolvem inúmeras e trabalhosas etapas, e a determinação final é realizada utilizando RP-HPLC-FDL e RP-LC-ESI-MS² ^{80,81,82,83}.

Observa-se, o uso crescente da técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas para determinação dos analitos. Entretanto, devido à baixa concentração em que se encontram os resíduos de analitos e a complexidade da matriz mel há a necessidade de realizar o preparo de amostra antes da análise propriamente dita. Esta etapa requer o isolamento e a concentração do analito de interesse, deixando o extrato compatível com o instrumento analítico usado para análise.

Recentemente, técnicas de extração baseadas em membrana líquida suportada (SLM) têm atraído atenção devido às vantagens que apresentam como baixo custo, simplicidade

operacional, descarte mínimo de solventes, alta seletividade, uso de pequenas quantidades de amostras e a combinação de extração e re-extração em uma única etapa^{84,85,86}.

Desta forma, um método analítico utilizando HFRLM no preparo de amostra e determinação por HPLC-MS/MS foi desenvolvido e validado para a análise de antibióticos pertencentes ao grupo das sulfonamidas em amostras de mel.

3.2.3 Parte experimental

3.2.3.1 Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas em série do tipo triplo quadrupolo (Quattro Micro API, Waters, Manchester, UK) acoplada um cromatógrafo a líquido (Alliance 2690, Waters, Manchester, UK). O espectrômetro de massas está equipado com a fonte de ionização do tipo Z-spray para ionização por eletronebulização (ESI). A voltagem do capilar empregado foi de 3,5 kV. A temperatura da fonte foi mantida em 120 °C, enquanto que a temperatura de dessolvatação foi mantida em 450 °C. O gás nitrogênio foi usado no cone e como gás de dessolvatação nas vazões de 50 e 680 L h⁻¹, respectivamente. O espectrômetro de massas foi operado no modo MS/MS, usando monitoramento de múltiplas reações (MRM). O argônio, com pureza de 99,8 % (Rio

de Janeiro, Brasil) foi usado como gás de colisão a uma pressão constante de 2×10^{-3} mbar. A Tabela 8 mostra as massas dos íons precursores e produtos que foram monitoradas, a energia de colisão ótima, à voltagem do cone e as características físico-químicas dos compostos.

Tabela 8. Valores de pKa, transições selecionadas e parâmetros instrumentais otimizados na determinação das sulfonamidas estudadas por LC-MS/MS.

composto	MRM (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
sulfadiazina	251,30→156,1 ^a	28	15
	251,30→91,7 ^b	28	30
sulfamerazina	265,29→172,2	28	16
	265,29→156,0	28	18
sulfametoxazol	254,25→160,1	40	16
	254,25→107,8	40	20
sulfametoxipiridazina	281,16→155,7	28	13
	281,16→91,3	28	25
sulfatiazol	256,22→156,0	27	16
	256,22→108,0	27	20

^a Transição de íon para confirmação

^b Transição de íon para quantificação

MRM – Monitoramento de reações múltiplas

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Nova-Pak C18-A (150 mm×3,9 mm i.d., 4 µm, Waters) mantida entre 20-30 °C. A fase móvel consistiu de metanol (solvente A) e solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico e 10 mmol L⁻¹ de acetato de amônio (solvente B). O gradiente de eluição aplicado com a vazão de 0,4 mL min⁻¹ foi o seguinte: condição inicial com 30% do solvente A mantido por 3 min, aumentando linearmente até 50% de A em 5 min, aumentando linearmente até 70% do solvente A por 2 min e mantido em 70% de solvente A por 3 min, retornando as condições iniciais em 0,1 min e mantido por 6 minutos.

As membranas utilizadas foram membranas capilares de polipropileno (modelo Accurel PP Q 3/2, 600 µm de diâmetro interno, 200 µm de espessura de parede e 0,2 µm de tamanho de poros e 75% de porosidade, Wuppertal, Alemanha).

3.2.3.2 Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e foram usados sem prévia purificação. Água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) com 18,2 MΩ cm⁻¹ de condutividade foi usada para preparar todas as soluções e fases móvel. Pentanol (Aldrich),

hexanol (Aldrich), heptanol (Aldrich), 1-octanol (Merck), cicloexanol (Merck), butanol (Merck), acetato de etila (Merck), e tolueno (Tedia, Rio de Janeiro) foram avaliados como solventes extratores. Os padrões de sulfonamidas, incluindo sulfadiazina (SD), sulfametoxazol (SMX), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SM) e sulfametoxipiridazina (SMP) foram obtidas da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Soluções estoques foram preparada em metanol e as soluções de trabalho metanol:água (50:50 v/v) e estocadas a -18 °C. Metanol grau HPLC (JT Baker) e ácido fórmico (Merck) foram usados como fase móvel. Sulfato de amônio (Synth) foi usado para alterar a força iônica.

3.2.3.3 Estratégias de otimização

A otimização dos parâmetros que afetam a extração dos antibióticos por HFRLM foi obtida por meio de ferramentas multivariadas. Uma superfície triangular foi usada para definir o melhor solvente de extração (pentanol, 1-octanol ou cicloexanol) para a extração líquida. O planejamento do tipo composto central⁸⁷ foi aplicado para estudar a influência da massa de amostra e do volume de solvente, assim como para avaliar o tempo e a temperatura de extração.

Estudos univariados foram realizados para verificar a influência do pH da amostra e do tipo de tampão utilizado na fase receptora sobre a eficiência de extração dos antibióticos em amostras de mel.

Para maximizar a extração simultânea dos antibióticos, para os três planejamentos, a média geométrica das áreas dos picos dos antibióticos foi usado como resposta no programa de computador empregado para o tratamento de dados e na obtenção das superfícies de resposta, permitindo a definição das condições ótimas. Bons níveis de detecção foram obtidos para todos os antibióticos. Contudo, resultados similares foram obtidos quando as áreas de cada antibiótico foram usadas como resposta na otimização. Os dados experimentais foram processados usando o programa Statsoft Statistica 6.0.

3.2.3.4 Preparo de amostra otimizado

A extração dos antibióticos de amostras de mel foi realizada usando HFRLM em um sistema de três fases. Em um frasco âmbar foi adicionado 0,625 g de mel, 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ (pH 5,0) e 300 µL de 1-octanol:pentanol (55:45 v/v).

A membrana porosa de polipropileno foi cuidadosamente cortada em segmentos de 8 cm e suas extremidades foram conectada a duas microseringas de 250 μL . Uma dessas microseringas, contendo 100 μL de solução receptora (tampão carbonato na concentração de $0,05 \text{ mL}^{-1}$ e pH 10,0) foi usada para preencher o lumen da membrana.

O frasco, fechado, contendo a amostra foi colocado em um banho com temperatura controlada (58°C). A extração foi realizada pela introdução do sistema de membranas no frasco. Sob agitação constante (1200 rpm), e depois de um tempo pré determinado, a solução receptora foi coletada pela segunda microseringa e 20 μL desta solução foram injetados no LC-MS/MS.

3.2.3.5 Validação

O desempenho do método foi avaliado usando as seguintes figuras de mérito: coeficiente de correlação, faixa linear, repetibilidade e precisão intermediária, recuperação relativa, limites de detecção e de quantificação, estabilidade e seletividade.

Curvas analíticas foram construídas para estimar a faixa linear, coeficiente de correlação e limites de detecção e

quantificação para a metodologia proposta por HFRLM-LC-MS/MS.

A linearidade do método foi avaliada pelo cálculo da regressão e foi expressa pelo coeficiente de correlação (r). A detectabilidade do método foi avaliada pela determinação do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), sendo que os mesmos foram calculados como três e dez vezes a razão sinal ruído, respectivamente.

A precisão foi calculada em termos de estimativa de desvio padrão relativo (do inglês, relative standard deviation, RSD) considerando-se como critério de aceitação desvios menores que 20%, avaliados para $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. A repetibilidade foi avaliada através de seis determinações realizadas em um mesmo dia. A precisão intermediária foi calculada a partir de seis determinações em três dias separados.

A recuperação relativa foi avaliada usando uma mistura de padrões e com os padrões individuais sobre a faixa linear dinâmica, em três níveis diferentes de concentração, isto é, baixo ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$), médio ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e alto ($400 \mu\text{g kg}^{-1}$). A recuperação relativa foi obtida com cinco replicatas para cada concentração.

A robustez, que é definida como o efeito que pequenas variações nas condições experimentais influenciam na resposta

analítica, foi estimada a partir das superfícies de respostas obtidas para cada variável que influencia no método.

A estabilidade da solução estoque foi testada mensalmente e comparada com soluções de trabalho recém preparadas.

3.2.4 Resultados e discussão

3.2.4.1 Efeito do sal, pH da amostra e fase receptora

Inicialmente, fez-se um estudo para verificar o efeito da adição de sal na amostra, o conhecido efeito *"salt outing"*, no qual as moléculas de água hidratam preferencialmente os íons provenientes do sal, liberando, desta forma, os analitos para que estes sejam extraídos pelo solvente orgânico. Os sais cloreto de sódio, sulfato de potássio e sulfato de amônio foram testados tendo sido adicionados à amostra em quantidade suficiente para ter-se uma solução saturada. Todos os sais estudados apresentaram efeito positivo sobre a eficiência de extração, porém, o sulfato de amônio mostrou efeito mais significativo. Uma possível explicação é a alta solubilidade e a presença da carga dupla no sulfato de amônio, o que promove um aumento considerável na força iônica da solução. Apesar da diferença

entre a força iônica da solução doadora e da solução de extração, não se observou nenhum processo osmótico no sistema proposto.

Para verificar a influência do pH da amostra, utilizaram-se duas soluções tampão, fosfato e acetato, e variou-se o pH de 1,5 a 6,0. É conhecido que o pH da amostra exerce influência sobre a eficiência de extração devido a possibilidade de ionização dos analitos. No método proposto, os analitos devem, necessariamente, estar na forma molecular para que ocorra interação com o solvente orgânico e, conseqüentemente a extração. Analisando a Figura 4, em pH mais ácidos pode ocorrer a protonação do grupo amino, reduzindo a interação com o solvente, enquanto que em pH elevados pode ocorrer a desprotonação dos mesmos, sendo observado que em pH 5,0 tem-se uma maior eficiência de extração, sendo, portanto, o mesmo selecionado para os demais estudos.

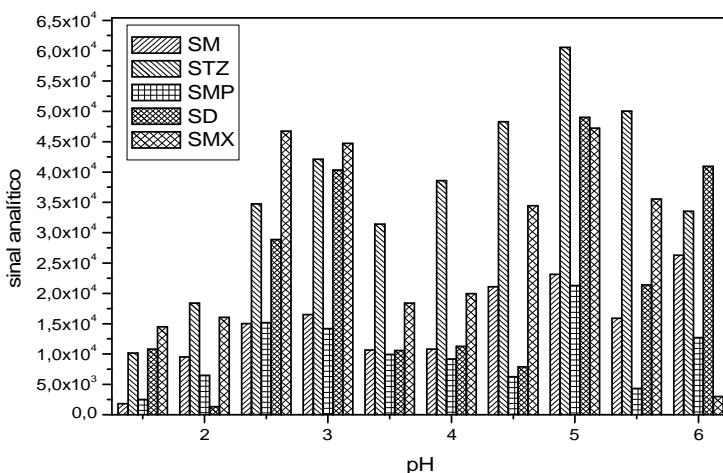


Figura 4 -. Estudo do pH da amostra. Condições experimentais: 300 μ L de 1-octanol, 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão no respectivo pH, 250 μ g/kg de padrão de cada sulfonamida e 0,5 g de amostra de mel orgânico. Fase receptora: 100 μ L de tampão carbonato em pH 10,0.

O sistema de três fases empregado em HFRLM está sob a influência do equilíbrio entre o analito na fase doadora/solvente e analito-solvente/fase receptora. Neste caso, o deslocamento do equilíbrio no sentido da fase receptora implica no aumento da eficiência de extração. Para isto, faz-se necessário que o íon seja armazenado nesta fase. Neste estudo, utilizou-se uma fase receptora a pH com mais de duas unidades acima do pKa dos

compostos em estudo (Tabela 7), o que promoveu a ionização do analito na interface analito-solvente/fase receptora e consequentemente a permanência do mesmo na fase receptora devido à falta de interação com o solvente. Um estudo foi realizado para verificar a influência de diferentes tampões sobre o sistema, cujos resultados são mostrados na Figura 5, na qual se observa que o tampão carbonato apresentou maior eficiência de extração para a maioria dos compostos em estudo.

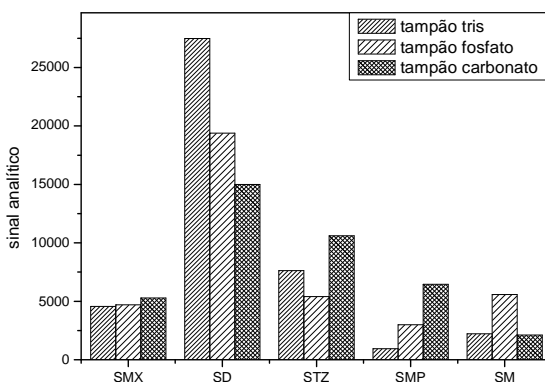


Figura 5. Estudo do tampão da fase receptora. Condições experimentais: 300 μ L de 1-octanol, 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 μ g/kg de padrão de cada sulfonamida e 0,5 g de amostra de mel orgânico. Fase receptora: 100 μ L do respectivo tampão em pH 10,0.

3.2.4.2 Efeito do solvente de extração

No método proposto, as polaridades do solvente orgânico e das sulfonamidas devem ser similares, para que um alto coeficiente de partição seja obtido. O efeito de alguns solventes extratores sobre a eficiência de extração foi estudado. Uma série homóloga de alcoóis: 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, ciclohexanol, 1-heptanol e 1-octanol foi selecionada para este estudo, devido a sua polaridade relativa aos analitos. Além destes, também foi estudado o tolueno e o acetato de etila. A partir destes estudos preliminares, verificou-se que os alcoóis 1-pentanol, ciclohexanol e 1-octanol apresentaram efeitos mais significativos, sendo então escolhidos para um estudo, utilizando a metodologia de superfície triangular, no qual os mesmos foram avaliados individualmente e em misturas binárias com 33% e 67% (v/v) de cada solvente e em misturas ternárias contendo 33% de cada solvente.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6. Observa-se uma região na qual se tem uma maior resposta quando da aplicação da mistura binária 1-octanol:1-pentanol (55:45 v/v). Esta condição foi selecionada e utilizada na continuação da otimização do método proposto.

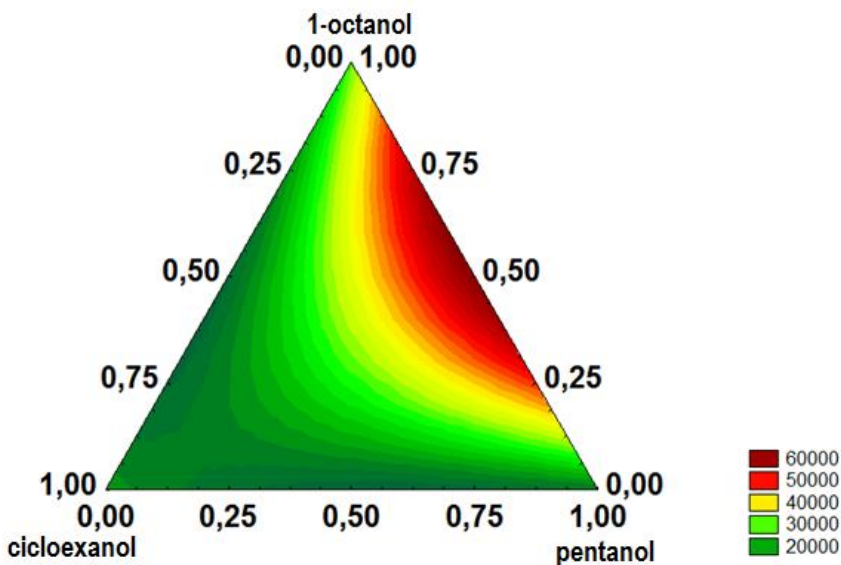


Figura 6. Estudo para seleção do solvente de extração por HFRLM com membrana de polipropileno e determinação por LC-MS/MS. Condições experimentais: 300 μ L de solvente, 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 μ g/kg de padrão de cada sulfonamida e 0,5 g de amostra de mel orgânico. Fase receptora: 100 μ L de tampão carbonato em pH 10,0.

3.2.4.3 Efeito do volume do solvente de extração e da massa de amostra

O volume do solvente empregado deve ser estudado já que o mesmo tem duas funções no método, a regeneração da

membrana líquida e a extração propriamente dita, sendo que pode ocorrer interação entre a massa de amostra utilizada e o volume de solvente. Na Figura 7 estão os resultados obtidos nos estudos sobre a influência do volume do solvente de extração e da massa de amostra. Analisando-se esta figura, observa-se que conforme aumenta a massa de amostra tem-se necessidade de aumentar o volume do solvente, como forma de compensação, uma vez que parte do solvente pode ficar retido pela amostra. Um volume de solvente muito elevado pode promover a diluição do extrato, o que causaria uma diminuição no sinal analítico. De acordo com o tratamento estatístico dos dados, observa-se que há uma região ótima, que corresponde às condições ótimas de extração e apresentam robustez adequada, pois observa-se que pequenas alterações nas condições de extração não provocam efeito significativo na resposta analítica. As condições ótimas estabelecidas foram 0,625 g de amostra de mel e 300 µL de solvente 1-octanol:pentanol (55:45 v/v).

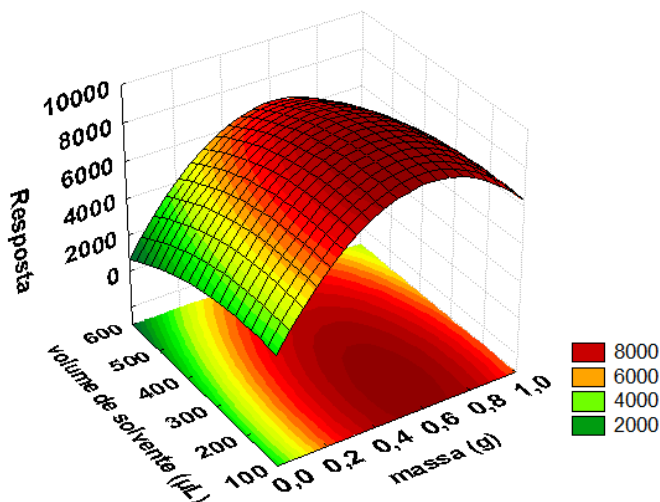


Figura 7. Estudo do efeito da massa de amostra e do volume de solvente na extração de sulfonamidas por HFRLM e determinação por LC-MS/MS. Condições experimentais: 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 $\mu\text{g/kg}$ de padrão de cada sulfonamida. Fase receptora: 100 μL de tampão carbonato em pH 10,0.

3.2.4.4 Efeito do tempo e da temperatura de extração

Assim como em outras técnicas de microextração (ex: SPME), a HFRLM é um processo dependente do equilíbrio e é controlado pela difusão. Desta forma, necessita normalmente de um período de exposição razoável para que o equilíbrio seja alcançado ⁶⁹. Neste caso, a quantidade máxima a ser extraída será conseguida quando o equilíbrio for atingido. A temperatura

também exerce um efeito significativo no processo, influenciando na difusão, na viscosidade da amostra e na solubilidade do solvente extrator na amostra, podendo causar a degradação ou degeneração da membrana líquida em SLM. No caso da técnica de HFRLM, esta degradação não deve ocorrer devido ao excesso de solvente presente na amostra, o qual renova constantemente a membrana líquida.

Na Figura 8, pode ser observada a superfície de resposta obtida no estudo do tempo e da temperatura de extração. Nesta, observa-se um incremento no sinal analítico com o aumento da temperatura e tempo, sendo que conforme a temperatura aumenta o tempo pode ser reduzido. Possivelmente, esse efeito se dá pelo aumento da difusão do analito através da membrana, porém, a partir de determinado conjunto de tempo e de temperatura esse sinal decresce. Isso pode ocorrer devido à degradação dos compostos em estudo já que os mesmos apresentam-se termicamente instáveis quando expostos a temperaturas mais elevadas. De acordo com a Figura 8 e com o tratamento estatístico dos dados, tem-se uma região com maior intensidade de sinal, que corresponde a condição ótima de temperatura e tempo de extração, sendo que nesta região observa-se que pequenas variações nas condições de tempo e temperatura não resultaram em variações consideráveis no sinal

analítico e, desta forma, pode-se afirmar que o método apresenta robustez adequada. As condições ótimas de tempo e temperatura de extração para este estudo foram de 40 minutos e 58 °C, respectivamente.

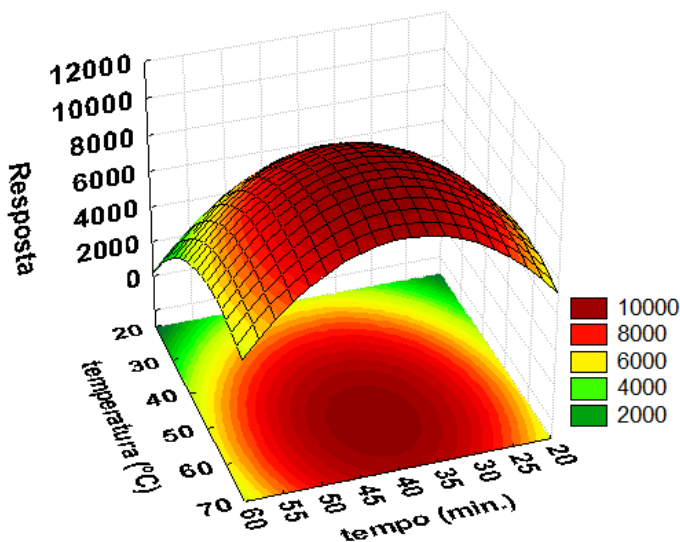


Figura 8. Estudo do efeito da temperatura e do tempo na extração de sulfonamidas por HFRLM e determinação por LC-MS/MS. Condições experimentais: 300 μL de 1-octanol:pentanol (55:45 v/v), 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de padrão de cada sulfonamida e 0,625 g de amostra de mel orgânico. Fase receptora: 100 μL de tampão carbonato em pH 10,0.

3.2.4.5 Validação do método

O método HFRLM-LC-MS/MS foi avaliado de acordo com os critérios descritos na secção 3.2.3.5. A Tabela 9 apresenta os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), assim como os parâmetros de calibração para todos os analitos estudados.

Os limites de detecção e de quantificação obtidos estão na faixa de 5,1 a 27,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 16,8 to 82,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados confirmam a aplicabilidade do método proposto na determinação das sulfonamidas em amostras de mel. A qualidade da linearidade foi comprovada através dos coeficientes de correlação superiores a 0,981.

Tabela 9. Parâmetros de validação para determinação de sulfonamidas em amostra de mel.

composto	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r	Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
sulfadiazina	11,1	36,7	0,987	25-500
sulfametoxazol	27,4	82,2	0,989	50-500
sulfatiazol	8,7	29,0	0,987	25-500
sulfamerazina	5,1	16,8	0,981	15-500
sulfametoxipiridazina	12,9	39,0	0,994	25-500

A precisão e recuperação relativa do método foram avaliadas em três concentrações inclusas na faixa linear dinâmica. Na Tabela 10 estão listadas as concentrações avaliadas e os valores calculados para os parâmetros de validação. A repetibilidade obtida para todos os compostos foi menor que 15%. A precisão intermediária foi menor que 13% para todos os compostos. As recuperações relativas foram obtidas entre 80,9 e 117,8, com variação menor que 15% para todos os compostos.

Tabela 10. Recuperação e precisão do método proposto.

compostos	Recup. (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (%)	Recup. (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (%)	Recup. (400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (%)	Repetibi- lidade (%) (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) n=6	Precisão inter- mediária (%) (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) n=6
sulfadiazina	90,9-96,5	92,3-117,8	101,8-114,8	9,2	8,2
sulfametoxazol	84,9-105,7	92,4-110,5	94,1-99,8	12,7	9,5
sulfatiazol	82,8-100,8	102,1-116,8	83,6-100,1	13,4	8,4
sulfamerazina	80,9-100,9	103,1-111,0	90,0-103,3	13,9	9,9
Sulfametoxi- piridazine	83,2-100,7	89,9-106,6	94,8-112,7	14,6	12,5

Sob as condições indicadas, as soluções estoques mostraram-se estáveis por 4 meses. Não houve perda significativa ou deterioração de qualquer um dos compostos de interesse durante as fases de preparo de amostra.

O método proposto apresentou boa seletividade, especialmente considerando a complexidade da matriz. Os cromatogramas obtidos usando o método proposto para um branco da amostra e para uma amostra de mel fortificada são mostrados na Figura 9. Observa-se pelos cromatogramas, que nenhum dos picos que ocorrem na amostra branca interfere na análise dos compostos em estudo.

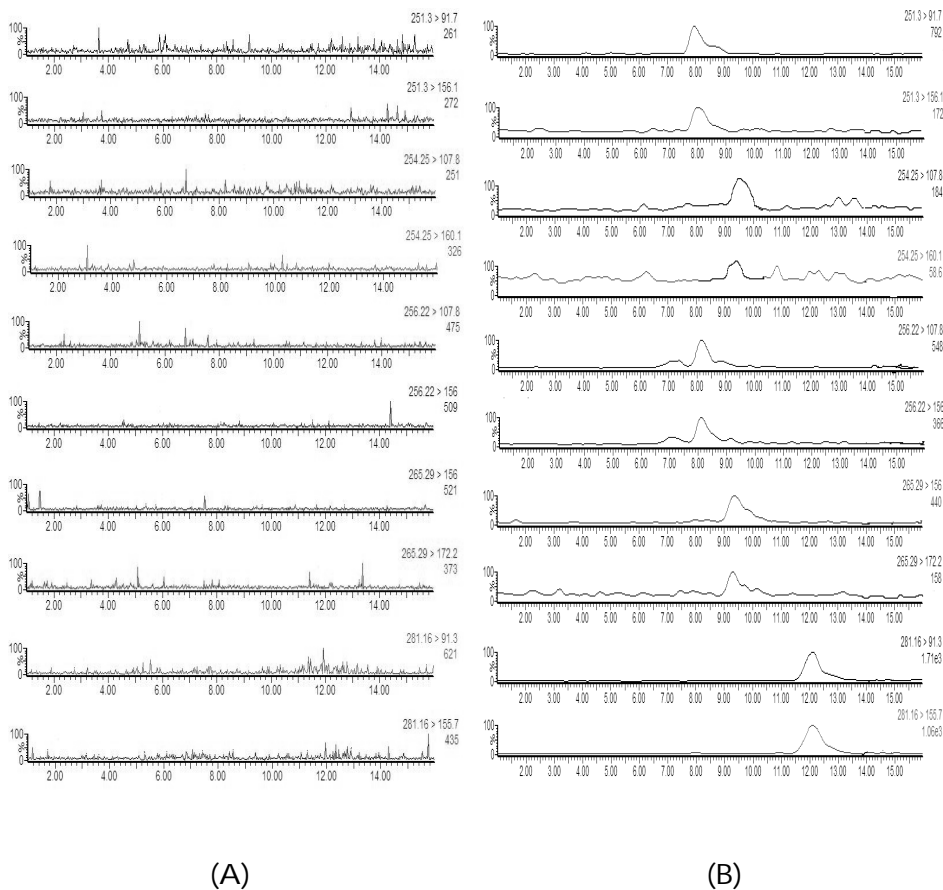


Figura 9. A) Cromatogramas de um branco de amostra após a extração por HFRLM e determinação por LC-MS/MS. B) Cromatogramas de uma amostra fortificada com 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de padrões de sulfonamidas. Eixo das abcissas é dado em tempo (min) e o eixo das ordenadas é dado em porcentagem de intensidade(%). Condições experimentais: 300 μL de 1-octanol:pentanol (55:45), 10 g de sulfato de amônio, 10 mL de

tampão acetato pH 5,0 e 0,625 g de amostra de mel orgânico.

Fase receptora: 100 µL de tampão carbonato em pH 10,0.

3.2.4.6 Aplicação do método em amostras de mel

A metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras de mel, adquiridas no comércio da cidade de Campinas (estado de São Paulo, Brasil), sendo três amostras de mel convencional e três amostras de mel orgânico (Tabela 11). As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 11. Análises das amostras comerciais de mel adquiridas no comércio de Campinas.

Amostras	SMP µg kg ⁻¹	SMX µg kg ⁻¹	STZ µg kg ⁻¹	SM µg kg ⁻¹	SD µg kg ⁻¹
1	<LQ ^a	<LQ	<LQ	ND	ND
2*	ND ^b	ND	ND	ND	ND
3*	ND	ND	ND	ND	ND
4*	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	<LQ	53±0,5	ND	<LQ

^a <LQ – menor que o limite de quantificação

^b ND – não detectado

*Amostras de mel orgânico

Entre as amostras analisadas, algumas continham as sulfonamidas sulfametoxipiradizina, sulfatiazol, sulfametoxazol e sulfadiazina em concentrações acima do LD do método, porém abaixo do LQ, com exceção da amostra 6. Entretanto, todas estão em conformidade com os limites máximos permitidos pelas agências reguladoras ⁸⁶(ANVISA e PNCR-2009).

3.2.5 Conclusões parciais

O método de HFRLM-LC-MS/MS para determinar sulfonamidas em amostras de mel apresentou baixo limite de quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e boas recuperações, precisão e linearidade. O método proposto apresenta as mesmas vantagens e desvantagens do HF-LPME: é simples, efetivo, de baixo custo, usa μL de solventes orgânicos e é livre de interferência da matriz. Por outro lado, HF-LPME é relativamente ineficiente para a maioria das substâncias polares. O método desenvolvido é relevante, uma vez que foi no primeiro estudo realizado que aplicou HFRLM na extração e na concentração de compostos orgânicos.

3.3 Análise de agrotóxicos organoclorados em amostras de água e frutas por microextração líquido-líquido combinada simultaneamente com extração em fase sólida por membrana porosa de polipropileno e determinação por GC-ECD e confirmação por GC-MS

3.3.1 Objetivos específicos

Desenvolver, validar e aplicar método utilizando microextração líquido-líquido combinada simultaneamente com extração em fase sólida por membrana porosa de polipropileno para determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de morango, tomate e água de rio.

3.3.2 Breve introdução

Nas últimas décadas, apesar da atenção estar mais centrada na separação e na detecção dos analitos, avanços significativos em técnicas de preparo de amostras tem sido apresentado. O interesse em miniaturização na área de química analítica tem levado a introdução de técnicas alternativas para extração, com o objetivo de substituir os processos convencionais/tradicionais de extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

Entre estas técnicas alternativas, a microextração em fase sólida (SPME), introduzida por Arthur e Pawliszyn,⁸⁸ basicamente deu início a miniaturização dos procedimentos de preparo de amostras em química analítica⁸⁹.

Atualmente, a SPME é amplamente aceita e aplicada como técnica de preparação de amostra, por ser simples, relativamente rápida e com elevado fator de enriquecimento/concentração. Ela é particularmente interessante para substituir técnicas que usam solventes⁹⁰.

Outra técnica de preparo de amostra que adquiriu relevância é a microextração em fase líquida (LPME) introduzida, inicialmente, por Dasgupta *et al.*⁶³ em 1996. A LPME é uma simplificação e uma minituarização da LLE, mas sobrepõem muitas das desvantagens da LLE, assim como algumas do SPME, como o efeito de memória⁹¹, considerando que devida as características oferecidas pela membrana, como baixo custo, essa pode ser usada uma única vez e descartada.

Dentre as possíveis configurações entre as quais a LPME pode ser aplicada está a HF-LPME na qual a LPME é auxiliada por uma membrana porosa/oca que estabiliza a fase extratora. Esta técnica foi introduzida por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen em 1999⁶⁶.

Uma nova configuração para HF-LPME, foi proposta recentemente por Zorita *et al.* ⁷⁵ e foi denominada de extração líquido- líquido por membrana microporosa (do inglês, hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction – HF-MMLLE). Usando a mesma configuração e baseado no fato de que a membrana microporosa pode funcionar como adsorvente de analitos, Montes *et al.* ⁷⁶ descreveram a aplicação de membrana porosa de polipropileno seca para a concentração de anisóis em matrizes aquosas.

Neste estudo, uma metodologia simples e de baixo custo, baseada no emprego simultâneo de microextração líquido-líquido (LLME) e extração em fase sólida com membranas microporosas (MMSPE) é apresentado. O procedimento proposto foi aplicado na concentração de agrotóxicos organoclorado presentes em águas de rio, tomate e morango. A otimização das várias variáveis que podem influenciar na extração foi realizada de forma multivariada. O método proposto foi comparado com a MMLLE, sendo que o mesmo se mostrou mais eficiente.

3.3.3 Parte experimental

3.3.3.1 Instrumentação

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-14B) equipado com detector

ECD (detector por capturas de elétrons) e a confirmação foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (GCMS-QP 2010 plus – Shimadzu). As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura do injetor do GC foi mantida constante em 300 °C, temperatura inicial da coluna foi mantida em 80 °C por 4 minutos, com uma taxa de aquecimento de 15 °C/min até 215 °C e mantida por 1 minuto, seguido de uma taxa de 2 °C/min até 230 °C, mantido por 3 minutos e finalmente uma taxa de 5 °C/min até 260 °C, mantido por 2 minutos. A temperatura do detector foi mantida constante em 300 °C. Para o GC-MS as condições cromatográficas foram idênticas as utilizadas no GC-ECD, porém para o espectrômetro de massas foi fixada a temperatura na interface de 260 e 220 °C para fonte de íons. A análise foi realizada no modo TIC com faixa de varredura da razão massa/carga de 100 a 500. Os picos foram identificados com base na sua fragmentação usando a NIST Mass Spectral Search Program 05 (NIST, Washington, D.C.).

Outros equipamentos utilizados incluem pHmetro (Mettler Toledo 320), banho de ultra-som (Ultra cleaner 1450), centrifuga (FANEM EXCELSA BABY II – 206R) e agitador magnético (MQAMA 301).

3.3.3.2 Reagentes e padrões

As soluções foram preparadas empregando-se água deionizada proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q® da Millipore® (Bedford, MA, USA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A limpeza dos aparatos de laboratório foi feita com o uso de uma solução 2% (v/v) de Extran® Merck neutro (Darmstadt, Alemanha) por imersão por 24 h, enxaguados com água destilada, então colocados durante 48 h em solução 20% (v/v) de ácido clorídrico Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e banho de ultrassom por 1 h. A seguir foram enxaguados com água deionizada. A mistura de 16 agrotóxicos foi adquirida da Sigma-Aldrich (EPA 608 pesticides mix (tolueno:hexano)). Também foi utilizado metanol grau HPLC (Tedia Brasil), octanol grau analítico (Merck), tolueno (Tedia Brasil), hexano (Tedia Brasil), e cloreto de sódio (Nuclear). As soluções estoques de padrão dos agrotóxicos estudados foram preparadas em metanol e mantidas a 4 °C. As soluções de trabalho, usadas para otimizar os parâmetros no método, foram preparadas, todos os dias, na concentração de 10 ng mL⁻¹. As amostras de tomate e morango foram adquiridas no comércio local. As amostras de água de rio foram coletadas no Rio Cubatão (Palhoça, Santa Catarina, Brasil) e no Rio Araranguá (Araranguá, Santa Catarina, Brasil) que são

fontes de abastecimento de toda população urbana da região de Florianópolis e Araranguá.

As membranas utilizadas são membranas capilares de polipropileno (modelo Accurel PP Q 3/2, 600 µm de diâmetro interno, 200 µm de espessura de parede e 0,2 µm de tamanho de poros e 75% de porosidade, Wuppertal, Alemanha).

3.3.3.3 Procedimento de preparo das amostras

As amostras de morango e tomate foram preparadas da mesma forma, de acordo com o procedimento descrito a seguir. Inicialmente pesaram-se 100 g de morango, sem folhas e caules, que foram colocados em um liquidificador e triturados até obter-se uma massa viscosa e homogênea. Posteriormente, foi transferido um grama de amostra para um béquer de 100 mL a qual foi adicionada uma mistura padrão de agrotóxicos (em µL) e deixado repousar por no mínimo 3 dias. Após o tempo de repouso, adicionaram-se 15 mL de água deionizada, ajustou-se o pH e levou-se ao ultrassom por 10 minutos. Após o tempo no ultrassom, a amostra foi centrifugada por 8 minutos (4000 rpm). Nesta etapa do processo, ocorre a separação da parte aquosa e da massa sólida. A parte aquosa, referente à amostra, foi colocada num frasco âmbar com capacidade total de volume de 20 mL,

sendo que neste frasco já foram previamente adicionados 2,91 g de cloreto de sódio. As amostras de água coletadas do rio Cubatão (Palhoça, SC) e do rio Araranguá (Araranguá, SC) não tiveram preparação prévia, apenas foi colocado o mesmo volume de 15 mL no frasco âmbar contendo o sal cloreto de sódio.

3.3.3.4 Extração simultânea por LLME e MMSPE

Após o procedimento de preparo da amostra, quando a mesma já se encontrava no frasco de extração foram adicionados 20 µL de octanol. Um segmento de membrana medindo 1,5 cm, previamente lavado com acetona, foi fixado sobre uma haste cilíndrica inerte. A haste, por sua vez, foi fixada em um septo de silicone que auxilia na vedação do frasco de extração. Todo o sistema anteriormente descrito foi colocado no interior de uma cela termostatizada sobre um agitador magnético, para que a temperatura e a agitação fossem mantidas constantes durante todo o processo de extração. De acordo com as condições otimizadas, o tempo de extração foi de 60 minutos e a temperatura de 59 °C. Posteriormente ao processo de extração, tem-se o processo de dessorção que consiste em deixar a membrana que contém o solvente extrator com o analito concentrado mergulhada em 30 µL de uma mistura de solventes

tolueno:hexano (60:40 v/v) durante 10 minutos. A dessorção foi efetuada em um microtubo com capacidade para 100 μL . Uma alíquota de 1 μL do solvente de dessorção foi coletada em uma microseringa de 10 μL e então injetada no cromatógrafo.

3.3.3.5 Estratégias de otimização

As variáveis que influenciam o sistema foram otimizadas utilizando ferramentas multivariadas. A otimização do solvente de dessorção a partir do MMSPE foi realizada através de um planejamento de misturas, no qual foram testados os solventes tolueno, 1-octanol e hexano. As condições foram selecionadas por meio da superfície de resposta triangular gerada.

As variáveis massa de sal, tempo e temperatura de extração foram otimizadas a partir de um planejamento Box-Behnken, sendo que os níveis estudados para o tempo foram de 20, 40 e 60 minutos, a temperatura foi estudada nos níveis 23, 45,5 e 70 °C e a massa de sal em 0, 2,5 e 5 g. A equação numérica gerada para cada superfície permitiu o estabelecimento dos pontos críticos que correspondem as condições ótimas de extração.

As otimizações das variáveis massa de amostra e volume de metanol sobre as amostras de morango e tomate foram obtidas através da análise de um planejamento do tipo composto central, sendo a massa de amostra estudada entre 0,250 g e 1 g e o volume de metanol de 0 a 200 μL . As condições obtidas para a amostra de morango foram aplicadas à amostra de tomate.

Para maximizar a extração simultânea dos agrotóxicos, para todos os planejamentos, a média geométrica das áreas dos picos dos agrotóxicos foi usada como resposta no programa de computador utilizado para o tratamento de dados e na obtenção das superfícies de resposta, permitindo a definição das condições ótimas. Bons níveis de detecção foram obtidos para todos os agrotóxicos. Contudo, resultados similares foram obtidos quando as áreas de cada agrotóxico foi usada como resposta na otimização. Os dados experimentais foram processados usando o programa Statsoft Statistica 6.0.

3.3.4 Resultados e discussão

Para estabelecimento das condições ótimas de extração, parâmetros que podem influenciar na técnica LLME-MMSPE foram avaliados, entre os quais estão a seleção do solvente orgânico de extração e de dessorção, o pH da fase doadora

quando a análise foi realizada em tomate e morango, tempo e temperatura de extração e a variação da força iônica da fase doadora através da adição de eletrólitos fortes.

3.3.4.1 Etapa de adsorção e dessorção

Um solvente apropriado para ser utilizado nesta técnica deve apresentar algumas características peculiares tais como baixa solubilidade em água, baixa volatilidade, compatibilidade com a membrana e um coeficiente de partição significativo. O solvente extrator 1-octanol foi selecionado de acordo com dados publicados na literatura para a extração de compostos semelhantes aos agrotóxicos utilizados neste trabalho ^{92,93}. Em estudos preliminares, determinou-se que a adição de 1-octanol na faixa de 20-40 μL permite obter eficiência máxima de extração. Dessa forma, um volume de 20 μL do solvente extrator selecionado foi usado para garantir um leve excesso em relação à capacidade de adsorção da membrana de polipropileno.

No processo de dessorção, seguindo o mesmo princípio do coeficiente de partição, realizou-se um estudo mais detalhado para escolher o melhor solvente ou mistura de solventes para extração dos analitos a partir do solvente extrator/membrana, considerando que se tem uma mistura de agrotóxicos que

diferem entre si em polaridade. Para isto, realizou-se um estudo, utilizando um planejamento fatorial completo, que resultou em uma superfície de resposta triangular na qual os solventes: tolueno, 1-octanol e hexano assim como suas respectivas misturas foram analisadas. Os resultados são mostrados na Figura 10. Observa-se uma região pronunciada de máximo na área onde se tem a mistura de tolueno e hexano, ou seja, uma maior eficiência de extração foi obtida quando se utiliza a mistura 60:40 (v/v) tolueno:hexano. Portanto, esta mistura foi usada como solvente de dessorção nos demais experimentos.

O efeito do tempo de dessorção sobre a eficiência de extração foi estudado e não foi verificado aumento significativo para tempos maiores que 10 minutos, portanto, este foi considerado o tempo ótimo para dessorção.

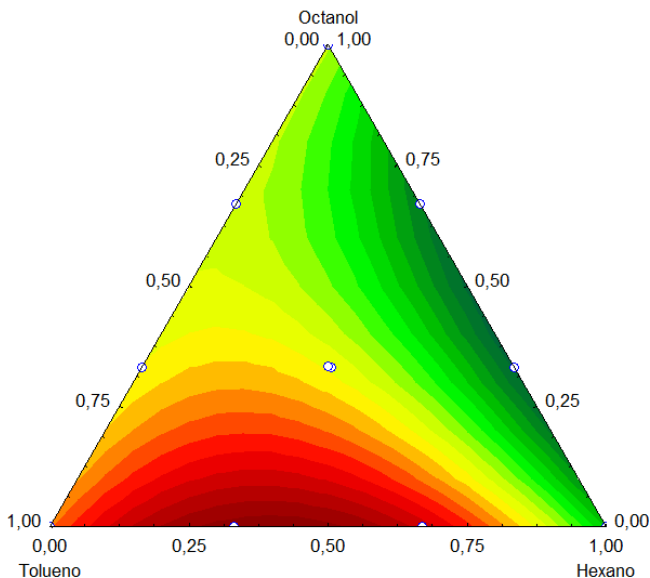


Figura 10. Superfície de resposta triangular obtida a partir da extração com os solventes: tolueno, 1-octanol e hexano. Condições experimentais: volume de amostra de 15 mL, temperatura de extração ambiente, tempo de extração 60 minutos e concentração da mistura de agrotóxicos $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ cada.

3.3.4.2 Efeito das condições de extração sobre a eficiência de extração

Em análises que envolvem um número razoável de compostos, mesmo que pertençam a mesma classe, há a possibilidade dos mesmos apresentarem comportamentos diferentes sob as mesmas condições. Esse comportamento pode

ser exemplificado quando se está analisando compostos com diferentes graus de volatilidade, os quais diferem seu comportamento diante da alteração da temperatura do meio, por exemplo. Desta forma, se faz necessário encontrar um compromisso entre os compostos. A partir do conhecimento prévio dos compostos estudados, realizaram-se experimentos preliminares nos quais se verificou que os mesmos apresentam comportamentos bastante distintos quanto a presença de sal, sendo este efeito demonstrado por um aumento na área cromatográfica para a maioria dos compostos de massa molar baixa e diminuição para a maioria dos compostos com massa molar elevada, quando se adiciona à solução doadora uma pequena massa de NaCl, ao contrário do que acontece quando é adicionado uma massa significativa de sal. Baseado no conhecimento do sistema, adquiridas nos experimentos iniciais, se faz necessário um estudo mais completo para encontrar um compromisso para a condição ótima de extração e entre as próprias variáveis que influenciam o sistema. O estudo destas variáveis significativas para o processo foi realizado através do planejamento fatorial completo em três níveis, sendo que através do mesmo foram geradas as superfícies de resposta mostradas na Figura 11.

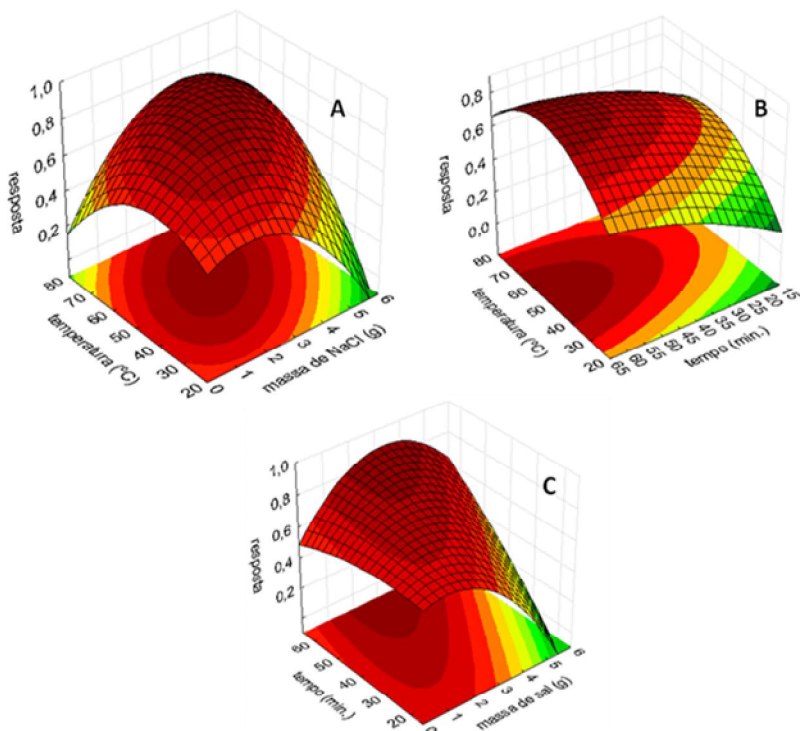


Figura 11. Superfícies de resposta construídas para otimização das variáveis massa de sal, tempo e temperatura a serem selecionadas para extração de uma mistura de agrotóxicos organoclorados. A) Estudo da temperatura e efeito da massa de sal. B) Estudo da temperatura e o efeito do tempo. C) Estudo da massa de sal e tempo de extração. Condições de extração: volume de amostra 15 mL, volume de 1-octanol 20 μL , concentração da mistura agrotóxicos 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, massa de sal variando de 0 a 5 g, temperatura variando de 23 a 70 $^{\circ}\text{C}$ e tempo variando entre 20 a 60 minutos.

Quando se trata de técnicas de extração baseadas na difusividade do analito, espera-se que a temperatura de extração exerça um efeito significativo. A difusividade do analito é diretamente proporcional a temperatura e inversamente proporcional a viscosidade do meio. Em geral, um aumento na temperatura propicia uma diminuição na viscosidade aumentando, conseqüentemente, o coeficiente de difusão. A temperatura também exerce efeito na solubilidade do solvente extrator na amostra e é uma das causas de degradação (degeneração) da membrana líquida na extração suportada por membranas (SLM). Esse efeito pode ser minimizado adicionando uma quantidade adequada de solvente.

Na Figura 11A, observa-se que um aumento da temperatura requer uma maior massa de sal. Isso se deve ao aumento de solubilidade do sal com o aumento da temperatura. A região de máximo, visualizada na superfície, abrange uma área consideravelmente elevada, permanecendo próxima ao ponto central. Esse mesmo comportamento é observado nas superfícies das Figuras 11B e 11C. Isto permite inferir robustez ao método.

As extrações suportadas por membrana, em geral, necessitam de um tempo longo de extração para atingir o equilíbrio, o que prejudica a frequência analítica. Na Fig. 11B,

observa-se um incremento no sinal analítico com um maior tempo de extração, que, como indicado na figura, tende ao máximo estudado. Neste caso, um compromisso entre a eficiência de extração e a frequência analítica deve ser estabelecido. O efeito da temperatura apresenta diferentes comportamentos. Na faixa de 20 a 40 °C observa-se um incremento no sinal analítico que se deve ao aumento na difusividade com aumento da temperatura, enquanto que na faixa de 40 a 70 °C o sinal analítico permanece praticamente constante e acima desta faixa há indicação de perda no sinal analítico, provavelmente pela diminuição na constante do coeficiente de partição.

A Fig. 11C mostra o estudo do tempo de extração e o efeito do sal sobre o mesmo. Em relação ao tempo de extração, o mesmo efeito observado na Fig. 11B é mantido, sugerindo que o tempo de extração será o máximo estudado. A massa de sal influencia diretamente sobre a viscosidade da amostra, logo uma massa mais elevada de sal provoca a queda do sinal analítico, como pode ser observado Fig. 11C.

Uma equação numérica é gerada a partir da superfície de resposta, permitindo definir as condições ótimas de extração que correspondem a: a massa de NaCl é de 2,91 g, temperatura de extração de 59 °C e tempo de extração de 60 minutos. Essas condições foram adotadas em todos os experimentos realizados.

3.3.4.3 Comparação entre os procedimentos de LLME-MMSPE e MMLLE

O uso de temperaturas de extração elevadas, geralmente, apresenta efeito positivo sobre a eficiência de extração, devido a sua influência sobre a difusão do analito, mas também afeta a viscosidade da amostra e a solubilidade do solvente de extração na amostra, causando a degradação (degeneração) da membrana em SLM, como discutido anteriormente. Esta degradação pode ser minimizada pela adição de uma quantidade adequada de solvente à amostra, o qual renova constantemente a membrana líquida. Então, a introdução de solvente diretamente na amostra faz com que ele atue não somente como extrator mas também na prevenção da degradação da membrana. Quando se introduz a membrana porosa de polipropileno seca na amostra inicia-se o processo de extração dos agrotóxicos contidos no solvente para os poros da membrana por forças de capilaridade. Este é o procedimento adotado no emprego do método desenvolvido LLME-MMSPE.

Para verificar a eficácia deste procedimento comparou-se com o empregado em MMLLE no qual o solvente fica empregado nos poros da membrana. Os resultados obtidos neste estudo podem ser visualizados na Fig. 12. Analisando esta figura verifica-se que,

exceto para o α -BHC, o sinal analítico foi mais intenso quando se adicionou o solvente diretamente na amostra.

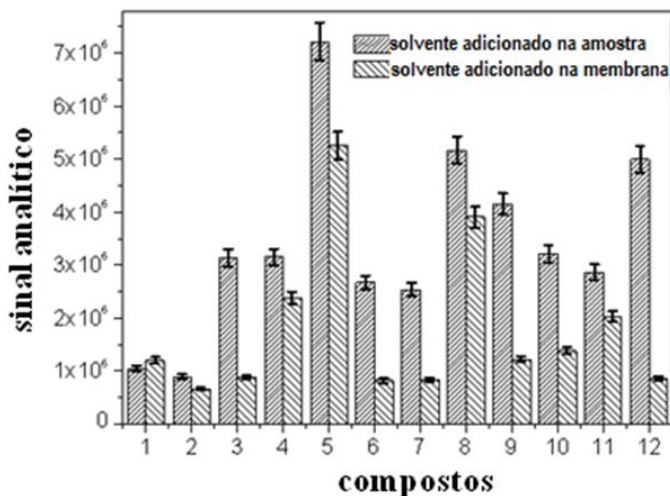


Figura 12. Efeito sobre o sinal analítico da adição de excesso de 1-octanol diretamente na amostra de morango na membrana. 1) α -BHC; 2) β -BHC; 3) γ -BHC; 4) Heptclor; 5) Aldrim; 6) Heptaclor epoxido; 7) Endosulfam I; 8) 4,4'-DDE; 9) Dieldrin; 10) Endrin; 11) Endosulfam II; 12) 4,4'-DDD; 13) 4,4'-DDT. Condições experimentais: volume de amostra líquida 15 mL, 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de extração 60 min, temperatura de extração de 59 °C, massa de NaCl 2,91 g e 1 g de massa de amostra.

A maior eficiência de extração obtida quando o 1-octanol foi introduzido diretamente sobre a amostra pode ser atribuída à

formação de micro gotas do solvente extrator no seio da amostra, favorecendo, desta forma, uma maior interação entre os analitos e o 1-octanol devido ao aumento na área superficial da gotícula.

3.3.4.4 Validação do método

Estabelecidas as condições de otimização, os parâmetros analíticos de validação como: linearidade, faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação relativa e precisão foram determinados a partir da obtenção de curva de analítica usando a técnica de concentração proposta.

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados como sendo 3 e 10 vezes a relação sinal/ruído, respectivamente. A estimativa do desvio padrão relativo foi calculada para sete extrações com soluções fortificadas de $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico. A Tabela 12 mostra a faixa linear de trabalho, a estimativa do desvio padrão relativo, os coeficientes de correlação e os limites de detecção e de quantificação do método proposto.

Tabela 12. Faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, coeficiente de correlação e RSD obtidos na

validação da metodologia para a extração de uma mistura de agrotóxicos organoclorados em água.

Agrotóxicos	Faixa linear (ng L ⁻¹)	r	(LD) ng L ⁻¹	(LQ) ng L ⁻¹	RSD (%) n=7
α -BHC	10- 600	0,9988	2,7	8,4	10,4
β -BHC	40- 600	0,9996	13,0	44,0	14,5
Δ -BHC	60- 600	0,9959	20,0	60,0	14,5
Heptchlor	35- 600	0,9988	9,2	39,6	9,2
Aldrim	35- 600	0,9981	11,0	39,6	10,4
Heptachlor epóxido	30- 600	0,9996	9,9	33,0	6,2
Endosulfam I	20- 600	0,9998	8,6	28,0	5,1
4,4'-DDE	40- 600	0,9978	12,0	42,9	10,7
Dieldrin	40- 600	0,9997	13,7	45,0	15,0
Endrin	30- 600	0,9996	13,3	31,1	6,6
Endosulfam II	30- 600	0,9976	10,0	35,0	5,9
4,4'- DDD	55- 600	0,9934	18,0	59,9	8,9
4,4'- DDT	20- 600	0,9988	7,9	26,0	9,9

Bons valores de coeficientes de correlação (r) foram obtidos, maiores que 0,993, mostrando que curvas analíticas com

boas linearidades foram obtidas. A metodologia proposta foi capaz de detectar todos os agrotóxicos em concentrações bem inferiores aos LMR estabelecidos pela legislação nacional e internacional para água doce.

Os limites de detecção obtidos nesta metodologia para a mistura dos organoclorados estudados em matrizes aquosas provenientes do meio ambiente estão entre 2,7 e 20,0 ngL⁻¹, semelhantes aos valores reportados na literatura que aplicam a técnica de HF-LPME à matrizes ambientais aquosas, nas quais os limites de detecção mostrados estão entre 1 a 47 ng L⁻¹ ^{76, 94,95}. A determinação destes mesmos agrotóxicos utilizando a técnica de SDME, nas mesmas matrizes, apresenta limites de detecção entre 10 e 200 ng L⁻¹ ^{96,97}, ou seja, a metodologia desenvolvida apresenta menores limites de detecção e de quantificação, o que atesta que o método desenvolvido pode ser empregado na análise dos compostos selecionados, mesmo que estejam presentes em concentrações muito baixas, a nível de traço.

3.3.4.5 Aplicação da metodologia de LLME-MMSPE-GC-ECD para extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de águas de rio

A metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras de águas oriundos dos rios Cubatão (Palhoça, Santa Catarina, Brasil)

e do rio Araranguá (Araranguá, Santa Catarina, Brasil). As amostras foram coletadas em pontos estratégicos da margem, próximo às plantações de tomate e milho. Avaliou-se o desempenho do método através da construção da curva analítica por adição padrão e ensaios de recuperação, a partir da adição de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto à amostra, sendo que o mesmo procedimento foi realizado em triplicata. A Tabela 13 apresenta as concentrações obtidas para cada agrotóxico nas amostras e as respectivas recuperações obtidas.

Tabela 13. Concentração e recuperação da extração dos agrotóxicos aplicando a metodologia desenvolvida com determinação por GC-ECD em amostras de água do Rio Cubatão e Araranguá.

Agrotóxicos	Rio Cubatão		Rio Araranguá	
	conc. amostra (ng L^{-1})	recuperação (%)	conc. amostra (ng L^{-1})	recuperação (%)
α -BHC	<LD	$103,5 \pm 3,7$	<LD	$108,8 \pm 8,9$
β -BHC	<LD	$90,0 \pm 1,4$	<LD	$118,3 \pm 8,3$
Δ -BHC	<LD	$115,0 \pm 2,3$	74 ± 14	$96,6 \pm 8,7$
Heptaclor	12 ± 4	$86,2 \pm 11,6$	<LD	$109,4 \pm 11,2$

Aldrin	161 ± 25	106,1 ± 10,0	<LD	116,6 ± 12,7
Heptaclor epóxido	<LD	94,9 ± 8,5	<LD	86,3 ± 10,1
Endosulfan I	<LD	104,9 ± 9,8	<LD	81,2 ± 7,9
4,4'-DDE	76 ± 25	105,6 ± 4,5	<LD	103,3 ± 14,7
Dieldrin	44 ± 20	107,5 ± 4,8	<LD	110,0 ± 9,2
Endrin	<LD	105,7 ± 3,5	<LD	119,1 ± 8,2
Endosulfan II	<LD	107,5 ± 1,3	<LD	118,7 ± 10,8
4,4'-DDD	<LD	115,0 ± 3,5	<LD	113,0 ± 10,2
4,4'-DDT	<LD	96,3 ± 6,5	<LD	112,5 ± 15,0

O método proposto forneceu recuperações boas, dentro da faixa recomendada na literatura. Ambas as amostras analisadas apresentaram os agrotóxicos estudados, porém em concentrações inferiores ao limite de detecção, com exceção do heptaclor, Δ -BHC, aldrin, 4,4'-DDE e dieldrin. As amostras coletadas no Rio Cubatão possuem uma maior contaminação por agrotóxicos, sendo que o 4,4'-DDE encontra-se em concentração próxima ao LMR. É importante, ainda, frisar que a metodologia desenvolvida não exigiu mínima preparação prévia de amostra para análise da mesma.

3.3.4.6 Aplicação da metodologia de LLME-MMSPE-GC-ECD para extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de morango e tomate

3.3.4.6.1 Otimização das condições para extração e concentração de agrotóxicos organoclorados em morangos

Amostras que apresentam maior complexidade na sua composição exigem um estudo mais detalhado para que sejam verificados fatores que possam interferir na análise. No caso do morango, por exemplo, sua composição apresenta macromoléculas e corantes que podem interferir na extração por possibilitarem a ligação entre as moléculas dos agrotóxicos e estas. Alguns artigos da literatura descrevem a co-solvência como um auxiliar no processo de extração, desta forma, procurou-se verificar se a adição de metanol durante o procedimento de preparo da amostra usando banho de ultrassom resultava em melhora na extração. A massa de amostra é outro fator que influencia no processo, devendo assim ser estudada para que uma condição ótima seja encontrada.

Um planejamento do tipo composto central com duas variáveis e cinco níveis foi utilizado para verificar os efeitos da adição de metanol, assim como a influência da massa de amostra.

Com as respostas obtidas, foi construída a superfície de resposta que se encontra na Fig. 13.

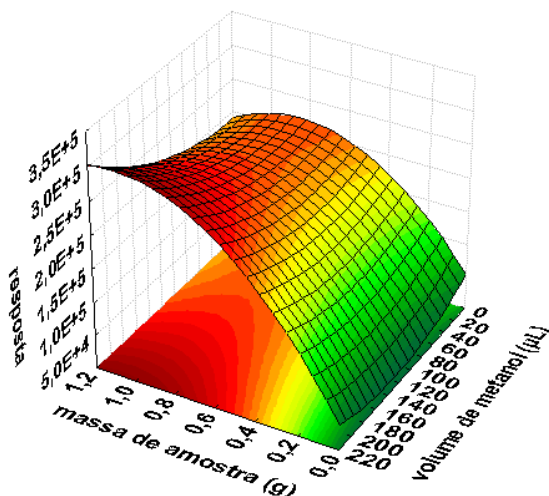


Figura 13. Superfície de resposta mostrando a influência da adição de metanol e massa de amostra na extração de agrotóxicos em morango. Condições experimentais: volume de amostra líquida 15 mL, $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de extração de 60 minutos, temperatura de extração de 59°C , massa de NaCl 2,91 g, massa de amostra variando entre 0,250 g e 1,00 g, volume de metanol variando entre 0 e 200 μL .

Observa-se, a partir da superfície de resposta, que uma massa de amostra maior apresenta um incremento no sinal

analítico, porém, diferentemente do esperado, adição do metanol não sugere um aumento significativo na área cromatográfica dos compostos. Assim, pode-se definir como condições ótimas 1 grama de amostra sem adição de metanol.

Devido à presença de corantes naturais no morango e sendo estes normalmente ionizáveis, uma possibilidade para evitar que apresentem interação com o solvente/membrana é modificar o pH da amostra. Um estudo foi realizado para verificar a influência do pH e assim determinar seu valor ótimo. Amostras nas mesmas condições e diferentes pH foram analisadas. A Fig. 14 mostra os resultados obtidos.

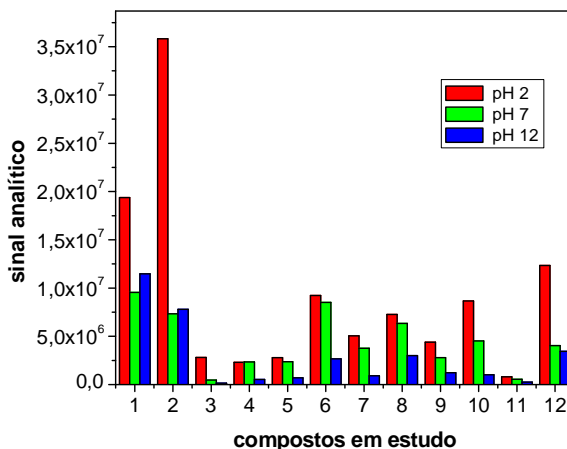


Figura 14. Influência do pH sobre o sinal analítico para amostras de morango. 1) α -BHC; 2) β -BHC; 3) Δ -BHC; 4) Heptclor; 5) Aldrinm; 6) Heptaclor epóxido; 7) Endosulfam I; 8) 4,4'-DDE; 9)

Dieldrim; 10) Endrim; 11) Endosulfam II; 12) 4,4'-DDD; 13) 4,4'-DDT; Condições experimentais: volume de amostra líquida 15 mL, 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de extração de 60 minutos, temperatura de extração de 59 °C, massa de NaCl 2,91 g e massa de amostra 1 g.

Através da Fig. 14, nitidamente se observa que em pH próximo a 2 há um incremento no sinal analítico para todos os compostos em estudo. Em meio fortemente ácido, como em pH 2, a maioria dos corantes existentes no morango tendem a permanecer no estado ionizado, favorecendo desta forma o procedimento de extração já que os mesmos não competem pela interação com o solvente e ainda evitam possíveis ligações químicas ou físicas com os compostos em estudo. O pH 2 foi selecionado para ser utilizado nos experimentos posteriores.

3.3.4.6.1.1 Validação e aplicação do método desenvolvido

LLME-MMSPE para agrotóxicos organoclorados em morango

Após o estabelecimento das condições ótimas de extração dos agrotóxicos selecionados para a amostra de morango foi avaliado o desempenho do método a partir da obtenção das figuras de mérito como limite de detecção e de quantificação, faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação e a recuperação.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados utilizando a razão sinal/ruído. Os ensaios de recuperação foram feitos em triplicata e em dois níveis de concentração, 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos para os parâmetros analíticos e a aplicação do método na análise de amostra de morango comercial.

Tabela 14. Parâmetros analíticos obtidos para a amostra de morango para os agrotóxicos organoclorados utilizando LLME-MMSPE e determinação por GC-ECD.

Agrotóxicos	Faixa linear $\mu\text{g kg}^{-1}$	r	LD $\mu\text{g kg}^{-1}$	LQ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Recup. (%)
α -BHC	2,0-70,0	0,997	0,57	2,00	84 \pm 12
β -BHC	2,0-70,0	0,992	0,60	2,00	70 \pm 6
Δ -BHC	2,0-100,0	0,992	0,69	2,30	94 \pm 15
Heptaclor	2,0-100,0	0,996	0,67	2,24	123 \pm 13
Aldrim	2,5-100,0	0,993	0,77	2,59	90 \pm 11
Heptaclor epóxido	2,0-100,0	0,995	0,63	2,10	101 \pm 10
Endosulfam I	2,0-100,0	0,999	0,50	1,69	83 \pm 6
4,4'-DDE	2,0-100,0	0,995	0,73	2,46	74 \pm 9

Dieldrim	3,0-100,0	0,999	1,10	3,30	106±14
Endrim	3,5-100,0	0,999	1,15	3,85	72±8
Endosulfam II	3,0-100,0	0,999	1,03	3,44	99±9
4,4'- DDT	3,0-50,0	0,998	1,06	3,50	105±6

De acordo com a Tabela 14, os limites de detecção e quantificação obtidos são considerados bons, possibilitando a detecção e quantificação em níveis de concentração muito baixos, isso deve-se, em parte, ao excelente “clean-up” da amostra oferecido pelo uso desta membrana. Quando se trata de amostras complexas, são aceitáveis porcentagens de recuperação de 60 a 125%, sendo assim, os valores encontrados são concordantes e compatíveis com os reportados na literatura. O composto 4,4'-DDD não pode ser quantificado sobre esta amostra já que o mesmo apresenta co-eluição com um componente da matriz.

O método validado foi aplicado na determinação dos agrotóxicos estudados em uma amostra de morango adquiridas em supermercados da cidade de Florianópolis, SC. Observou-se a presença de todos os agrotóxicos, porém em níveis inferiores ao limite de detecção, com exceção do 4,4'-DDE cuja concentração encontrada foi de $(3,7 \pm 0,1) \mu\text{g kg}^{-1}$. Os agrotóxicos organoclorados não fazem parte das classes de agrotóxicos empregados nessa cultura, mas os mesmos podem ser

encontrados devido a má prática agrícola, que muitas vezes utiliza agrotóxicos não indicados para a cultura em consideração.

A confirmação da presença ou isenção dos agrotóxicos organoclorados na amostra analisada foi realizada pela injeção do extrato obtido no cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massas com fonte de ionização por EI e a biblioteca NIST.

3.3.4.7 Otimização das condições para extração e concentração de agrotóxicos organoclorados em tomates

As amostras de tomate apresentam características semelhantes às de morango. Assim, realizaram-se alguns ensaios somente para confirmar a hipótese se a adição de metanol e massa de amostra influenciaria na eficiência de extração. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as condições ótimas a serem empregadas no processo de extração são similares as obtidas para morango, sem adição de metanol no banho de ultrassom e 1 g de amostra.

O pH da amostra, por outro lado, deve ser avaliado já que a composição da matriz difere-se em relação aos corantes e macromoléculas. Todas as demais condições foram mantidas constantes, variando-se apenas o pH da amostra. Os resultados são mostrados na Fig. 15.

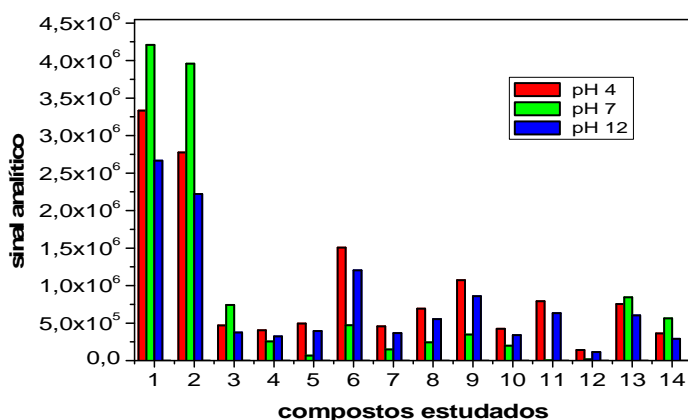


Figura 15. Influência do pH da amostra no sinal analítico para amostras de tomate. 1) α -BHC; 2) β -BHC; 3) Δ -BHC; 4) Heptaclor; 5) Aldrim; 6) Heptaclor epóxido; 7) Endosulfam I; 8) 4,4'-DDE; 9) Dieldrim; 10) Endrim; 11) Endosulfam II; 12) 4,4'-DDD; 13) 4,4'-DDT; Condições experimentais: volume de amostra líquida 15 mL, 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de extração de 60 minutos, temperatura de extração de 59 °C, massa de NaCl 2,91 g e massa de amostra 1 g.

A Fig. 15 mostra que para valores de pH de 4 e 7 obtêm-se melhores sinais analíticos em comparação com pH 12, porém, a melhora de sinal mais significativa ocorre em pH 4 para a maioria dos compostos, sendo então fixado para os demais experimentos.

3.3.4.7.1 Validação e aplicação do método desenvolvido, LLME-MMSPE-GC-ECD, para determinação de agrotóxicos organoclorados em tomate

Após o estabelecimento das condições ótimas de extração dos agrotóxicos na amostra de tomate, foi avaliado o desempenho do método a partir da obtenção de parâmetros analíticos como limite de detecção e de quantificação, faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação e a recuperação. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados utilizando a razão sinal/ruído. Os ensaios de recuperação foram feitos em triplicata e em dois níveis de concentração, 5 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos para os parâmetros analíticos e a aplicação do método de LLME-MMSPE-GC-ECD na análise de amostra de tomate.

Tabela 15. Parâmetros analíticos obtidos na validação do método, LLME-MMSPE-GC-ECD, para determinação de agrotóxicos clorados em tomate.

Agrotóxicos	Faixa linear $\mu\text{g kg}^{-1}$	r	LD $\mu\text{g kg}^{-1}$	LQ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Recup. (%)
α -BHC	2-80	0,999	0,46	2,00	104 \pm 10
β -BHC	10-230	0,999	2,90	10,00	75 \pm 7
Δ -BHC	20-230	0,996	6,46	21,52	59 \pm 2
Heptaclor	20-230	0,997	6,49	21,63	69 \pm 8

Aldrim	30-230	0,992	9,93	33,06	83±12
Heptaclor epóxido	10-230	0,998	3,60	12,03	96±9
Endosulfam I	5-230	0,999	1,65	5,49	91±8
4,4'-DDE	10-230	0,997	4,06	13,53	96±8
Dieldrim	10-230	0,998	3,78	12,60	109±10
Endrim	25-230	0,988	8,12	27,05	114±7
Endosulfam II	40-230	0,986	12,77	42,53	91±12
4,4'-DDD	20-230	0,995	6,20	20,66	100±5
4,4'-DDT	10-230	0,997	3,88	12,93	116±2

O desempenho do método aplicado a amostra de tomate, obtida no comércio local, mostrou-se satisfatória quanto aos parâmetros analíticos de mérito, principalmente considerando-se a complexidade da matriz em estudo, indicando assim que o uso da membrana oferece um excelente “clean-up” da amostra. Somente o α -BHC, entre os agrotóxicos organoclorados estudados, foi encontrado na amostra em concentração ($0,20 \pm 0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$) acima do limite de detecção. Da mesma forma que ocorre para a cultura de morango, a classe de agrotóxicos

organoclorados não é indicado para a cultura de tomate, porém, devido a má pratica agrícola os mesmos são aplicados a essas culturas.

A ANVISA, que estabelece os LRM de agrotóxicos em várias culturas não apresenta em sua legislação limites máximo de resíduos para morango e tomate para essa classe de agrotóxicos.

3.3.5 Considerações parciais

O uso simultâneo de LLME e MMSPE para determinar os agrotóxicos organoclorados em diversas matrizes apresentou baixos limites de detecção (ng L^{-1}), boa precisão, exatidão e linearidade. O método é simples, com baixo consumo de solvente orgânico, não apresenta efeito de matriz e isento de efeito de memória.

3.4 Determinação multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja industrializado e in natura por extração líquido-líquido utilizando membrana microporosa de polipropileno (HF-MMLLE) e determinação por cromatografia líquida – eletronebulização - espectrometria de massas em série (LC-ESI-MS/MS)

3.4.1 Objetivos específicos

Desenvolver, validar e aplicar uma metodologia utilizando microextração líquido-líquido com membrana microporosa de polipropileno como suporte sólido para determinação multirresidual de agrotóxicos, listados pela ANVISA, em amostras de sucos de laranja industrializado e recém preparados. Para separação, confirmação e quantificação dos agrotóxicos estudados foi empregada a LC-ESI-MS/MS.

3.4.2 Breve introdução

O uso de agrotóxicos em culturas de frutas é necessário para o controle de pragas que provocam a redução da produção e ainda, para o aumento da qualidade das frutas que é geralmente requerida pelos consumidores. Os agrotóxicos normalmente são

aplicados nas plantações. Entretanto, eles podem também ser aplicados após a colheita das frutas para mantê-las protegidas. Estes agrotóxicos podem permanecer nas frutas, como resíduos, e serem transferidos a partir das frutas para os sucos, aumentando o risco à saúde humana ⁹⁸.

O risco de resíduos de agrotóxicos depende de sua habilidade em causar efeitos adversos à saúde humana e a quantidade destes resíduos na dieta. Existe uma legislação específica que controla a quantidade permitida de cada resíduo visando minimizar o risco à saúde humana associada ao seu consumo. No Brasil, agências governamentais têm listados os níveis de tolerância destes compostos conhecidos como limites máximos de resíduos permitidos (LMR), os quais são dados na faixa de parte por milhão ^{99,100}.

Desta forma, há um aumento de demanda para o desenvolvimento de métodos seletivos e sensíveis para determinação de agrotóxicos de múltiplas classes em sucos de frutas e frutas frescas⁹⁸. A dificuldade no desenvolvimento de métodos para determinação de multiclasses de agrotóxicos está relacionada às grandes diferenças nas propriedades físico-químicas existentes entre elas ⁵⁰.

Entre as técnicas analíticas para determinação de resíduos, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica

de separação efetiva para os agrotóxicos não voláteis e termicamente instáveis, assim como a cromatografia gasosa é para compostos voláteis e termicamente estáveis.

A LC-MS usando a fonte de ionização por eletronebulização (ESI) ou ionização química a pressão atmosférica (APCI) são poderosas ferramentas na determinação de traços de agrotóxicos, devido a sua elevada detectabilidade e sua seletividade comparada a detectores convencionais usados em cromatografia líquida. A alta seletividade provém da seleção de fragmentos iônicos específicos ^{50,101,102,103,104,105,106}.

Uma das desvantagens da ionização em LC é a fragmentação limitada quando comparado à ionização por EI usada em GC-MS. Porém isso pode ser superado utilizando-se espectrometria de massas em série (MS/MS). Esse processo também eleva a seletividade da análise, devido à possibilidade reduzida de ter-se um interferente com íon precursor e um fragmento secundário com a mesma razão m/z do analito. Ambas as técnicas LC-MS e LC-MS/MS têm sido aplicadas na determinação de uma grande variedade de agrotóxicos pertencentes a diferentes classes químicas ^{50, 101,102,103,104,105,106}.

A confirmação inequívoca de compostos com resultados positivos é baseada no princípio do número máximo de pontos de identificação (IP) proposto pela Comissão Européia (European

Commission Decision 002/657/EC) e pelos procedimentos de controle de qualidade de análises de resíduos de agrotóxicos, SANCO No 10232/2006 ⁵⁰.

A análise de matrizes complexas, como sucos de frutas frescas ou comerciais, compreende uma etapa de preparo de amostra, na qual estão incluso o *clean-up* e a concentração dos analitos. Tradicionalmente, a extração líquido-líquido tem sido empregada para esta proposta. Entretanto, a LLE emprega grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos e consome um tempo considerável. Outras técnicas como a SPE e, mais recentemente, o QuEChERS e extração com solvente empregando ultrassom têm sido utilizadas, mas assim como a LLE também apresentam-se trabalhosas, demoradas e com consumo considerável de solvente ^{50,55,57,105,106}. Consequentemente, várias técnicas de extração têm sido desenvolvidas para sobrepor esses problemas. Entre essas técnicas tem-se a SPME e, mais recentemente, a extração por barra sortiva (SBSE) e ainda variações da microextração em fase líquida têm-se mostrado promissoras.

Uma nova configuração empregando a microextração em fase líquida é obtida pelo emprego de membrana microporosa e extração líquido-líquido (HF-MMLLE), na qual se tem a microextração em fase líquida suportada por uma membrana

microporosa de polipropileno, que funciona como suporte sólido e favorece a formação em sua superfície de uma membrana líquida renovável. Desta forma, o sistema apresenta maior estabilidade quando comparado a microextração em gota única e ainda um incremento na reprodutibilidade e eficiência de extração. Nesse sistema, aplica-se a dessorção em solvente orgânico antes da análise instrumental, que se mostra conveniente, permitindo que a técnica seja empregada tanto para análises por cromatografia gasosa quanto cromatografia líquida, sendo as propriedades dos analitos o limitante do método.

Neste estudo, uma metodologia simples e de baixo custo baseada na aplicação de microextração líquido-líquido e da membrana microporosa é apresentada. O método desenvolvido foi aplicado na concentração, isolamento e determinação por LC-MS/MS de dezoito agrotóxicos de diferentes classes (organofosforados polares, carbamatos, neonicotinamidas, amidas, pirimidinas, benzimidazol e triazol) presentes em suco de laranja industrializado e fresco.

3.4.3 Parte experimental

3.4.3.1 Reagentes e padrões

A água foi obtida a partir do sistema Milli-Q® Ultrapure Water Purification Systems (Millipore, Brussels, Bélgica). Os

reagentes acetato de etila (Tedia, USA), hexano (Tedia, USA), acetona (Tedia, USA), tolueno (Tedia, USA), sulfato de amônio (Synth, Brasil), acetonitrila (Tedia, USA), metanol (JT Baker, Holanda), ácido fórmico (Merck, Alemanha), acetato de amônia (Merck, Alemanha), cloreto de sódio (Synth, Brasil), hidróxido de sódio (Synth, Brasil) foram utilizados neste estudo. Os padrões de agrotóxicos diuron (Chem Service, USA), diflubenzurom, triclorfom, pirimifós-metil, imidacloprido, abamectina, bromacila, ametrina, acetamiprido, acefato, diazinona, carbofuram, carbendazim, difenoconazol, malationa, tebuconazol, clorpirifós e tiofanato-metil, foram obtidos da Pestanal (Alemanha). As soluções padrão foram preparadas em metanol e as soluções de trabalho foram preparados em metanol:água (50:50 v/v) e estocadas -18 °C. O suco industrializado e as frutas frescas foram adquiridos no comércio de Campinas (São Paulo, Brasil). As membranas utilizadas consistem em capilares de polipropileno (modelo Accurel PP Q 3/2, 600 µm de diâmetro interno, 200 µm de espessura de parede e 0,2 µm de tamanho de poros e 75% de porosidade (Wuppertal, Alemanha).

3.4.3.2 Procedimento de preparo de amostra

A extração dos agrotóxicos de suco de laranja industrializado e de suco fresco foi realizada utilizando o sistema

de HF-MMLLE. Em um frasco de 20 mL foram adicionados: 9 mL de suco, que foi centrifugado por 5 minutos, 4 g de sulfato de amônio, ajustado a pH 5,0 com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e 400 µL de tolueno: acetato de etila (85:15 v/v). Um segmento de membrana medindo 1,5 cm, previamente lavado com acetona, foi fixado em uma haste cilíndrica inerte. A haste foi fixada sobre o septo de silicone que auxilia na vedação do frasco de extração. Todo o sistema descrito foi colocado no interior de uma cela termostatzada que se encontrava sobre um agitador magnético, utilizado para manter a temperatura e agitação constantes durante todo o processo de extração. As condições otimizadas para extração correspondem ao tempo de extração de 35 minutos e a temperatura de 25 °C. Posteriormente à extração tem-se à dessorção dos analitos, a qual consiste em deixar a membrana contendo o solvente extrator concentrado com o analito mergulhada em 50 µL de uma mistura metanol:acetona (50:50 v/v) durante 2 minutos em banho ultrasônico. A dessorção foi efetuada em um microtubo com capacidade para 100 µL. Após este processo, 20 µL do extrato foram injetados no LC-ESI-MS/MS.

3.4.3.3 Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Quattro Micro API, Waters, Manchester, UK) acoplado a um cromatógrafo a líquido (Alliance 2690, Waters, Manchester, UK). O espectrômetro de massas está equipado com a fonte de ionização do tipo Z-spray para ionização por eletronebulização (ESI). A voltagem do capilar foi de 35 V. A temperatura da fonte foi mantida em 120 °C, enquanto que a temperatura de dessolvatação foi mantida em 450 °C. O gás nitrogênio foi usado no cone e como gás de dessolvatação nas vazões de 60 e 650 L h⁻¹, respectivamente. O espectrômetro de massas foi operado no modo MS/MS, usando monitoramento de múltiplas reações (MRM). O argônio, com pureza de 99,8%, (Rio de Janeiro, Brasil) foi usado como gás de colisão a uma pressão constante de 2×10⁻³ mbar. A Tabela 16 mostra a massa dos íons precursores e produtos que foram monitoradas, a energia de colisão ótima, a voltagem do cone e o tempo de retenção dos compostos.

Tabela 16. Transições selecionadas, parâmetros instrumentais ótimos e tempo de retenção para os agrotóxicos estudados.

Agrotóxicos	t _R (min)	SRM transitions m/z	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
Diflubenzurom	25,6	311,06 → 157,7	18	7
		311,06 → 140,6	18	31
Triclorfon	6,4	256,89 → 108,3	25	16
		256,89 → 126,5	25	15
Pirimifós- metill	29,4	306,10 → 107,4	40	32
		306,10 → 163,8	40	23
Imidacloprido	7,8	256,04 → 174,8	26	17
		256,04 → 209, 0	26	12
Abamectina [Na ⁺]	32,3	895,81 → 751,5	48	59
		895,81 → 182,9	48	41
Bromacila	13,2	260,99 → 204,8	21	13
		260,99 → 187,7	21	27
Ametrina	19,9	228,08 → 185,8	34	18
		228,08 → 115,4	34	27
Acetamiprido	9,0	223,05 → 125,5	28	17
		223,05 → 186,9	28	13
Acefato	3,6	184,0 → 142,6	17	7
		184,0 → 124,5	17	18
Diazinona	28,5	305,06 → 168,8	33	20
		305,06 → 152,7	33	21

Carbofurano	16,6	222,09 → 164,8	20	10
		222,09 → 122,5	20	19
Diuron	19,5	233,20 → 71,5	28	16
		233,20 → 159,8	28	25
Carbendazim	6,1	192,04 → 159,7	25	15
		192,04 → 131,7	25	30
Difenoconazol	28,2	406,07 → 250,9	34	27
		406,07 → 336,9	34	16
Malationa	25,8	331,07 → 126,5	22	11
		331,07 → 210,8	22	19
Tebuconazol	25,4	308,14 → 150,7	31	23
		308,14 → 124,5	31	36
Clorpirifós	31,1	349,91 → 197,8	23	16
		349,91 → 152,6	23	13
Tiofanato-metil	15,8	343,03 → 150,7	26	18
		343,03 → 310,9	26	10

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Nova-Pak C18-A (150 mm×3,9 mm i.d., 4 µm, Waters) mantida entre 20-30 °C. A fase móvel consistiu acetonitrila (solvente A) e solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mmol L⁻¹ de acetato de amônio (solvente B). O gradiente de eluição foi aplicado com uma vazão de 0,4 mL min⁻¹ utilizando curva linear e o seguinte programa de eluição: A:B 25:75 (v/v) por 5 min; A:B 35:65 (v/v) por 5 min; A:B 45:55 (v/v) por 5 min; A:B 60:40 (v/v)

por 5 min; A:B 75:25 (v/v) por 3 min, A:B 85:15 (v/v) por 2 min; A:B 95:5 (v/v) por 3 min retornando as condições iniciais em 0,1 min e mantido por 5 minutos antes da próxima injeção.

3.4.3.4 Estratégias de otimização

A otimização dos parâmetros que afetam a extração dos agrotóxicos usando HF-MMLLE foi realizada utilizando ferramentas multivariadas. A metodologia de superfície triangular foi usada para definir o melhor solvente de extração (hexano, tolueno e acetato de etila) e de dessorção (acetonitrila, metanol e acetona), objetivando maior eficiência de extração. O planejamento composto central foi aplicado para estudar a influência do volume e do pH da amostra, assim como para avaliar o volume de solvente de extração, tempo e temperatura de extração. Foram realizados experimentos em 5 níveis e com 5 replicatas no ponto central. Um estudo univariado foi realizado para verificar a influência da massa e do tipo de sal sobre a eficiência de extração. Para maximizar a extração simultânea dos agrotóxicos, em todos os planejamentos, a média geométrica das áreas dos picos dos agrotóxicos foi usada como resposta no programa de computador utilizado para o tratamento de dados e na obtenção das superfícies de resposta permitindo a definição

das condições ótimas. Bons níveis de detecção foram obtidos para todos os agrotóxicos. Contudo, resultados similares foram obtidos quando as áreas de cada agrotóxico foram usadas como resposta na otimização. Os dados experimentais foram processados usando o programa Statsoft Statistica 6.0.

3.4.4 Resultados discussão

3.4.4.1 Efeito do pH e do volume de amostra

As características físico-químicas dos agrotóxicos em estudo influenciam na eficiência de extração do sistema proposto. A extração se dá pela interação do analito com o solvente orgânico. Para tanto os analitos devem apresentar altos coeficientes de partição amostra/solvente orgânico. De acordo com a Tabela 5, observa-se que os agrotóxicos possuem diferentes pKa, podendo estarem ionizados em pH ácidos ou muito alcalinos. Portanto, tem-se a necessidade de estabelecer um compromisso para se obter a extração simultânea de agrotóxicos com características diferentes. O pH também pode influenciar na extração dos agrotóxicos da matriz. O volume de amostra foi estudado, mantendo constante a massa de analito, para verificar a influência da matriz na extração.

Na Figura 16, visualiza-se a superfície de resposta que mostra a influência do pH e do volume de amostra na eficiência

de extração. Analisando a Figura 16, observa-se que em pH neutro ou próximo de 7,0 tem-se uma maior resposta. O volume de amostra não mostrou efeito significativo sobre a extração, sendo adotado 9 mL como o volume ótimo.

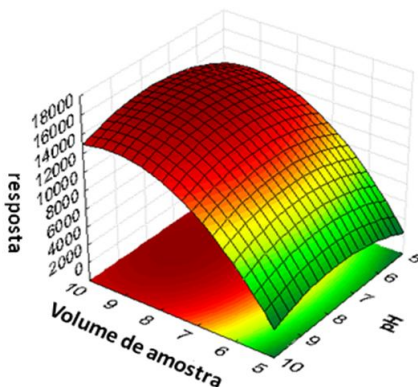


Figura 16. Superfície de resposta gerada no estudo do volume e do pH da amostra sobre a eficiência de extração dos agrotóxicos por HF-MMLLE. Condições experimentais: 4 g de cloreto de sódio, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico, tempo de extração 30 min., temperatura ambiente, $150 \mu\text{L}$ de tolueno para extração e $50 \mu\text{L}$ de metanol para dessorção.

3.4.4.2 Efeito do sal

A eficiência de extração depende do coeficiente de partição amostra-solvente orgânico. Este coeficiente pode ser alterado pela força iônica da solução, através da adição de eletrólitos inertes, o conhecido efeito *salting out*. Para otimização

das condições ótimas de extração do método proposto, foi estudado a adição de diferentes tipos e massas de sais (cloreto de sódio e o sulfato de amônio), sendo mantidas as mesmas condições para ambos. Analisando a Figura 17 verifica-se que tanto o cloreto de sódio como o sulfato de amônio podem contribuir para o aumento na eficiência de extração, desde que se utilize uma massa adequada de sal. Para efeito de apresentação dos dados e verificação da melhor condição para extração simultânea dos analitos utiliza-se a média geométrica das áreas dos picos como resposta.

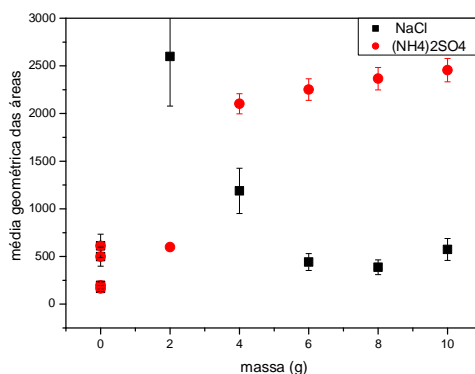


Figura 17. Estudo do efeito da adição de NaCl e (NH₄)₂SO₄ sobre a eficiência de extração. Condições experimentais: 500 µg L⁻¹ de cada agrotóxico, 9 mL de suco em pH 7, tempo de extração 30 min., temperatura ambiente, 150 µL de tolueno para extração e 50 µL de metanol para dessorção.

O comportamento observado na Fig. 17 pode ser explicado pelo efeito conhecido como supressão iônica. Supressão iônica é uma forma de efeito de matriz que afeta a técnica de LC-MS independente da detectabilidade ou seletividade do analisador de massas utilizado. A supressão iônica afeta de forma drástica e negativa as figuras de mérito, como a capacidade de detecção, precisão e exatidão.

O desconhecimento da origem e do mecanismo da supressão iônica torna esse problema de difícil solução na maioria dos casos. Modificações de componentes instrumentais e parâmetros, separação cromatográfica e preparo de amostra são considerados os principais meios para redução ou eliminação da supressão iônica ¹⁰⁷.

Existem várias possíveis fontes que originam a supressão iônica tais como compostos endógenos provenientes da matriz da amostra, substâncias exógenas como moléculas que originalmente não estavam presentes na amostra e foram inseridas na etapa de preparo de amostra, podendo citar os polímeros extraídos dos tubos empregados no preparo de amostra e sais ¹⁰⁸.

Os mecanismos através dos quais ocorre a supressão ainda não são completamente conhecidos, mas se pode sugerir

duas explicações possíveis para o efeito observado. No monitoramento MRM, define-se como razão massa/carga a ser analisada a massa/carga a partir do analito protonado, desprotonado ou o respectivo aduto. Porém, na presença excessiva de sódio em solução ocorre a formação do aduto (MNa^+) que possui razão massa/carga diferente da monitorada, provocando, dessa forma, uma perda expressiva na detectabilidade do método.

A perda de detectabilidade a partir da adição do NaCl também pode estar relacionada a influência que a presença de sódio apresenta quando da utilização da fonte de ionização em questão, a eletronebulização (ESI). Nesta fonte de ionização, microgotículas carregadas contendo o analito e a fase móvel são formadas. Após a evaporação do solvente, ocorre uma diminuição no tamanho da gota e os íons são ejetados e posteriormente analisados. Nesta etapa é que a presença de sódio torna-se crítica já que, devido ao nível de solvatação este tende a permanecer no interior da gota, assim como os adutos formados. Além disso, como o sódio é um elemento carregado este interfere na formação da própria gota durante o processo de eletronebulização, contribuindo de maneira negativa sobre a detectabilidade da análise. Além disso, observa-se que utilizando o NaCl para ajuste da força iônica, obtém-se uma menor

repetibilidade atribuída provavelmente a variação na quantidade de aduto formado.

Existe a possibilidade de formação de adutos com o íon NH_4^+ (M NH_4^+), porém para os agrotóxicos estudados verificou-se que a afinidade dos mesmos para formação deste aduto não é significativa, conforme mostrado na Fig. 17.

As análises foram realizadas em triplicata e observou-se que para uma massa de NaCl de 2 g uma maior resposta analítica foi obtida, enquanto que para o sulfato de amônio a partir de uma massa de 4 g ocorre uma saturação. Devido à resposta apresentada para a referida massa de cloreto de sódio ser significativamente maior comparada a resposta utilizando o sulfato de amônio, realizou-se um estudo no qual foi analisada a estimativa do desvio padrão relativo (RSD, $n=6$) para extrações utilizando 2 g de cloreto de sódio e para extrações utilizando 4 g de sulfato de amônio, já que, como citado anteriormente a supressão iônica pode causar comprometimento na precisão e exatidão do método. Os RSD encontrados utilizando cloreto de sódio foram superiores a 57%, enquanto que utilizando sulfato de amônio não passam de 15%. Desta forma, a massa de sal selecionada para continuidade dos experimentos foi 4 g de sulfato de amônio.

3.4.4.3 Seleção do solvente de extração e dessorção

Devido a metodologia proposta basear-se na partição do analito entre a amostra e o solvente orgânico de extração, tal solvente deve apresentar boa interação com os analitos e ao mesmo tempo potencial para extrair todos os analitos simultaneamente, conservando características como elevada afinidade com a membrana e baixas volatilidade, toxicidade e solubilidade em água.

A metodologia desenvolvida compreende a extração de agrotóxicos de diferentes classes que possuem diferentes polaridades e interações com a amostra, assim é possível que uma mistura de solventes com diferentes polaridades proporcione maior eficiência de extração. O estudo do solvente de extração foi realizado utilizando tolueno, hexano e acetato de etila e superfície triangular (Fig. 18) que contempla mistura binária, ternária e cada solvente isoladamente.

Na Fig. 18, observa-se que a mistura dos solventes tolueno e acetato de etila (85:15 v/v) resulta em uma maior eficiência de extração sendo, desta forma, selecionada para os demais experimentos.

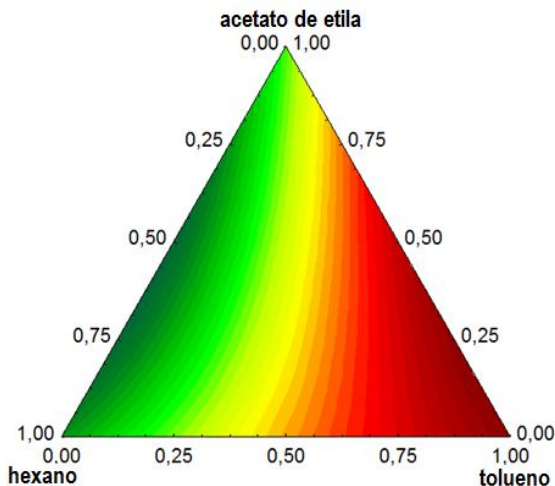


Figura 18. Superfície triangular obtida no estudo de diferentes solventes e proporções usados para extração dos agrotóxicos por HF-MMLLE. Condições experimentais: 4 g de sulfato de amônio, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico, 9 mL de suco em pH 7, tempo de extração 30 min, temperatura ambiente e 50 μL de metanol de solvente de dessorção.

Após a otimização do procedimento de extração, tem-se o processo de dessorção líquida, no qual a membrana fica imersa em 50 μL de solvente de dessorção. O solvente de dessorção deve apresentar, além de elevada solubilidade dos analitos, compatibilidade com a fase móvel e com a detecção instrumental empregada. De maneira similar ao solvente de extração, o

solvente de dessorção foi estudado utilizando a metodologia de superfície triangular (Fig. 19).

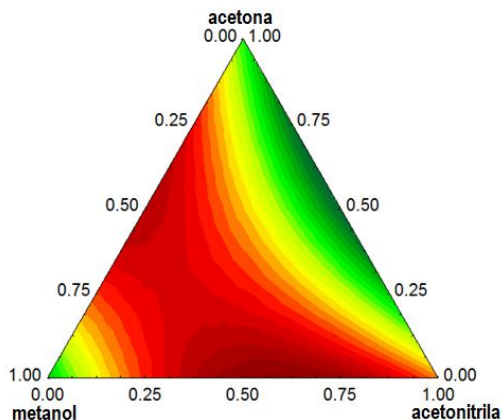


Figura 19. Efeito de diferentes solventes usados para extração dos agrotóxicos por HF-MMLLE. Condições experimentais: 4 g de sulfato de amônio, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico, 9 mL de suco em pH 7, tempo de extração 30 min., temperatura ambiente, 150 μL de tolueno:acetato de etila (85:15 v/v) para extração e 50 μL de solvente de dessorção.

Na Fig. 19, observa-se que há uma equivalência na eficiência de extração quando se emprega uma solução de metanol:acetonitrila (50:50 v/v) ou metanol:acetona (50:50 v/v). A

solução de metanol e acetona (50:50 v/v) foi selecionada para os demais experimentos.

3.4.4.4 Efeito de volume de solvente de extração, tempo e temperatura de extração

O volume do solvente, tempo e temperatura de extração foram otimizados usando um planejamento composto central. Para cada fator foram estudados 5 níveis: para temperatura 25; 36,25; 47,5; 58,75 e 70 °C, para tempo de extração 15; 26,3; 37,5; 48 e 60 min. e para volume de solvente de extração 0; 100; 200; 300 e 400 µL da solução de tolueno:acetato de etila (85:15 v/v) em 9 mL de amostra de suco. A partir dos resultados obtidos, a combinação dos três fatores foi plotado gerando três superfícies de resposta (Fig. 20). Então, a equação da regressão quadrática foi obtida para cada superfície de resposta e os valores ótimos para cada fator selecionados.

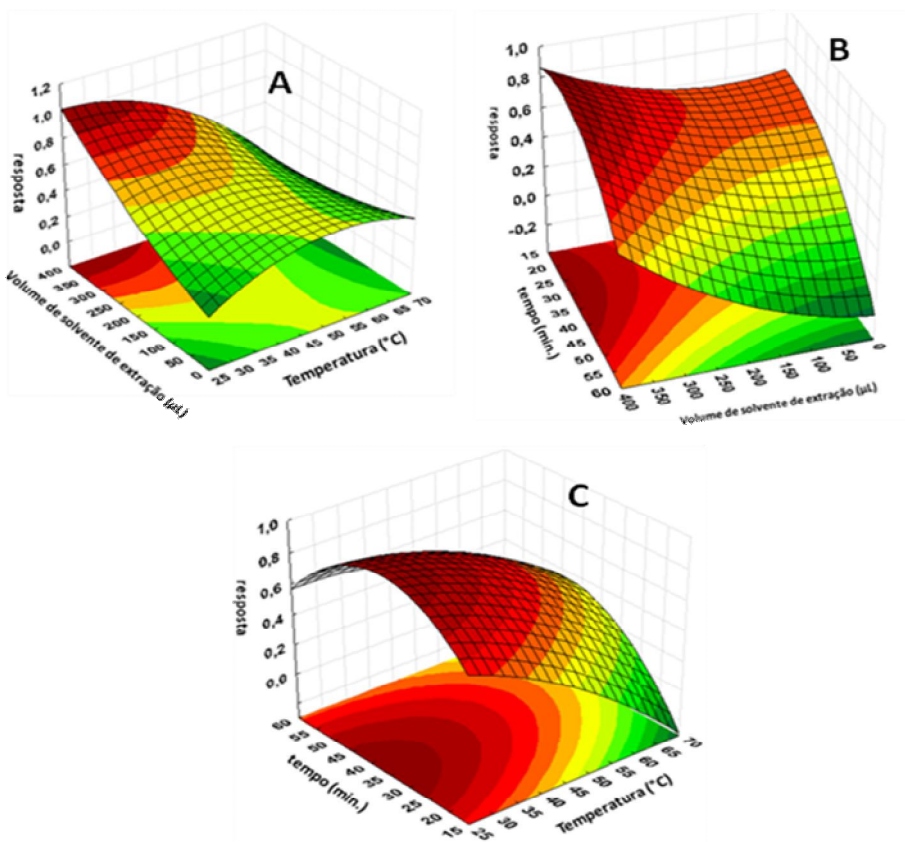


Figura 20. Superfície de resposta para otimização das variáveis volume do solvente de extração, tempo e da temperatura de extração. A) Efeito do volume do solvente de extração e temperatura sobre a eficiência de extração. B) Efeito do tempo e do volume de solvente de extração sobre a eficiência de extração. C) Efeito da temperatura e tempo de extração sobre a eficiência de extração. Condições experimentais: volume de amostra 9 mL,

volume do solvente de dessorção 50 μ L (metanol:acetona 50:50 v/v), temperatura de extração de 25 a 70 °C, tempo de extração de 15 a 60 min e volume do solvente de extração de 0 a 400 μ L (tolueno:acetato de etila 85:15 v/v).

Como anteriormente citado, para técnicas de extração baseadas em difusão é esperado que o tempo e a temperatura apresentem efeitos importantes sobre a eficiência de extração.

A influência do tempo e da temperatura de extração são dependentes da amostra e dos analitos. A Fig. 20A mostra que a temperatura não apresentou efeito significativo sobre a eficiência de extração, permitindo que a mesma fosse realizada em temperatura ambiente. O volume de solvente tende ao máximo, isso pode ser devido à complexidade da amostra e alguma possível perda do solvente por formação de microemulsão. Observa-se, também que, na ausência de solvente ocorre a extração apenas pela membrana, porém com eficiência significativamente menor se comparada com a extração na presença de solvente. A tendência ao volume máximo do solvente é confirmado quando se estuda o efeito do tempo e do volume do solvente de extração (Fig. 20B), onde se observa que o volume do solvente tende ao máximo, enquanto o tempo fica próximo ao ponto central, permitindo elevada frequência analítica. Esse efeito

observado para o tempo de extração pode ser devido à formação de microemulsão na amostra, considerando que o volume de solvente é de 400 μL , acarretando assim em uma perda no sinal analítico para tempos elevados. A Fig. 20C esta de acordo com as superfícies anteriores, mostrando pouca influência da temperatura e do tempo de extração próximo ao ponto central. Observa-se que para todas as superfícies apresentadas a região de máximo onde se encontram as condições ótimas, não são pontuais inferindo robustez na metodologia desenvolvida.

Além da complexidade da matriz, que demanda preparo mínimo antes da extração, conservando assim a sua integridade, deve-se considerar, para entender os efeitos apresentados, a diversidade dos analitos. Tem-se analitos com massas variando de 183,17 g mol^{-1} (acefato) a 866,60 g mol^{-1} (abamectina), fator importante uma vez que o processo é controlado por difusão. Além disso, tem-se diferenças na polaridade e interação com os componentes da matriz. O mais importante é obter um comprometimento para que ocorra extração eficiente de todos os agrotóxicos simultaneamente. Assim, a região de máximo corresponde à temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, tempo de extração de 35 min e volume do solvente de extração (tolueno:acetato de etila 85:15 v/v) de 400 μL . Estes valores foram selecionados e aplicados no estudo.

3.4.4.5 Figuras de mérito e exatidão

A partir das condições otimizadas, as figuras de mérito foram determinadas para cada tipo de amostra (suco industrializado normal e light e suco de laranja fresco). Construíram-se as curvas analíticas para determinar a faixa linear, o coeficiente de correlação, limite de detecção e de quantificação para o método proposto utilizando HF-MMLLE. Os limites de detecção e quantificação foram calculados como 3 e 10 vezes a razão sinal/ruído, respectivamente.

O suco industrializado *“light”* apresenta em sua composição, além dos componentes do suco de industrializado normal a goma xantana, sucralose e acessulfame de potássio, componentes esses que influenciam na eficiência de extração dos agrotóxicos e podem provocar supressão iônica.

Os resultados obtidos para o suco industrializado, suco industrializado *“light”* e suco de laranja fresco estão resumidos nas Tabelas 17, 18 e 19, respectivamente. Os coeficientes de correlação obtidos foram bons para todas as matrizes estudadas. Para a amostra de suco industrializado normal, o método mostrou uma excelente repetibilidade e precisão intermediária sendo ambas calculadas a partir da estimativa do desvio padrão relativo ($n=6$) usando soluções fortificadas com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada

agrotóxico, com valores entre 4,66 – 7,38% e 7,41 – 15,42 %, respectivamente.

Estudos de recuperação relativa foram realizados para as três matrizes usando diferentes níveis de concentração ($100 \mu\text{g L}^{-1}$, $300 \mu\text{g L}^{-1}$, $500 \mu\text{g L}^{-1}$, $2500 \mu\text{g L}^{-1}$ and $9000 \mu\text{g L}^{-1}$ para todas as amostras), mostrando excelentes resultados considerando a complexidade das matrizes.

Os agrotóxicos triclorfom, abamectina e clorpirifós não puderam ser quantificados devido ao efeito de supressão iônica causada pela matriz do suco industrializado “light”. Exceto esses, o método proposto apresenta bons LD e LQ, provavelmente devido ao excelente *clean-up* promovido pela membrana, mostrando que o método pode ser aplicado aos diferentes tipos de sucos de laranja. Os valores de LD obtidos pelo método proposto são similares dos métodos baseados em HF-LPME para amostras semelhantes.

Tabela 17. Parâmetros analíticos obtidos para o método proposto para determinação de agrotóxicos em suco de laranja industrializado normal usando a membrana de polipropileno no sistema de HF-MMLLE.

Agrotóxico	Faixa linear mg L ⁻¹	r	LD mg L ⁻¹	LQ mg L ⁻¹	Recuperação % (mg L ⁻¹)					Repetibilidade (0,5 mg L ⁻¹ /n=6) %	Precisão Intermediária (0,5 mg L ⁻¹ /n=6) %
					0,1	0,3	0,5	2,5	9		
Acefato	0,3 – 10	0,999	0,15	0,50	--	66,1-94,7	85,0-107,4	91,5-99,7	82,6-79,8	4,6	7,4
Carbendazim	0,3 – 7	0,999	0,11	0,37	--	76,0-94,7	92,7-101,3	100,4-116,3	--	6,9	11,0
Acetamiprido	0,05 – 3	0,999	0,018	0,06	109,5-116,2	70,3-97,5	100,6-106,6	88,6-115,4	--	6,0	11,3
Imidacloprido	0,5 – 10	0,991	0,16	0,54	--	--	117,9-118,5	85,2-87,7	--	5,9	13,8
Triclorfon	0,05 – 7	0,995	0,02	0,06	106,7-115,7	90,7-109,8	90,4-111,4	76,8-90,9	--	5,5	12,9
Ametrina	0,01 – 1	0,997	0,003	0,01	87,3-111,6	72,7-117,2	94,5-100,4	--	--	6,2	14,6
Bromacila	0,05 – 3	0,999	0,022	0,07	81,1-87,0	104,2-120,2	89,6-96,0	109,7-112,5	--	7,3	12,6

Carbofuram	0,03 – 0,5	0,99 9	0,011	0,036	82,0- 103,8	105,2-120,9	94,9- 101,4	--	--	6,9	11,9
Tiofanato- metil	0,3 – 10	0,99 8	0,07	0,25	--	85,4-120,2	116,1- 117,6	94,0-101,3	90,2-117,8	7,3	12,7
Diurum	0,05 – 5	0,99 9	0,03	0,09	107,5- 109,7	84,8-114,4	103,4- 107,3	115,6-120,8	86,5-115,8	7,1	11,3
Pirimifós- metílico	0,5 – 10	0,99 1	0,30	0,99	--	--	99,8- 103,9	93,0-115,5	114,4-115,3	7,0	15,4
Tebuconazol	1,0 – 10	0,99 6	0,33	1,11	--	--	--	84,1 -120,2	87,0-115,9	5,8	12,6
Diflubenzurom	0,1 – 5	0,99 7	0,04	0,13	88,8- 106,7	91,8-108,8	110,4- 118,8	97,6-103,5	--	6,7	14,7
Malationa	0,5 – 5	0,99 1	0,26	0,85	--	--	102,1- 115,6	104,2-117,0	--	6,8	14,2
Diazinona	0,3 – 10	0,99 7	0,10	0,33	--	72,4-78,2	96,2- 101,2	76,2-79,5	90,1-120,3	7,4	15,5
Difenoconazol	0,2 – 10	0,99 8	0,06	0,20	--	86,3-101,4	103,6- 104,2	87,9-120,8	78,1-115,6	6,5	13,5
Clorpirifós	0,2 – 10	0,99 8	0,07	0,23	--	99,59- 102,47	85,4- 119,0	86,7-120,6	95,6-116,5	7,5	15,5
Abamectina	0,2 – 10	0,99 2	0,09	0,27	--	78,90-98,70	86,4-95,8	93,2-99,6	95,3-119,5	6,9	14,2

^a LD – limite de detecção ^b LQ – limite de quantificação

Tabela 18. Faixa linear, coeficiente de correlação, recuperação e limite de detecção e de quantificação obtidos para o método proposto para determinação de agrotóxicos em suco de laranja industrializado “light” usando a membrana de polipropileno no sistema de HF-MMLLE.

Agrotóxico	Faixa linear (mg L ⁻¹)	R	LD mg L ⁻¹	LQ mg L ⁻¹	Recuperação % (mg L ⁻¹)				
					0,1	0,3	0,5	2,5	9
Acefato	0,3 – 5	0,988	0,13	0,42	--	109,2-118,5	98,5-100,9	104,1-108,9	--
Carbendazim	1 – 10	0,994	0,35	1,16	--	--	--	86,3-120,2	116,9-120,2
Acetamiprido	0,1 – 3	0,999	0,04	0,13	95,9-103,5	84,3-117,1	100,0-120,7	99,0-107,6	--
Imidacloprido	0,3 – 10	0,999	0,11	0,36	--	61,9-68,6	71,2-93,9	78,1-116,8	82,6-99,1
Ametrina	0,01 – 1	0,993	0,003	0,01	89,9-119,4	93,3-98,6	85,1-93,1	--	--
Bromacila	0,05 – 3	0,998	0,02	0,06	79,9-92,7	65,8-73,2	85,6-90,1	91,5-99,2	--
Carbofuram	0,03 – 0,5	0,999	0,01	0,03	73,1-91,8	82,4-101,8	74,2-90,9	--	--
Tiofanato- metil	0,5 – 10	0,998	0,17	0,56	--	--	116,5-119,7	100,7-106,1	75,2-103,7
Diurom	0,02 – 1	0,999	0,008	0,02	79,1-85,9	116,6-120,6	98,5-103,5	--	--
Pirimifós- metílico	0,5 – 10	0,998	0,20	0,68	--	--	108,7-115,1	96,8-99,4	82,8-87,2
Tebuconazol	1 – 10	0,992	0,49	1,60	--	--	--	103,8-107,2	91,8-96,5
Diflubenzurom	0,05 – 5	0,999	0,03	0,09	97,4-101,6	100,6-101,4	67,7-99,8	73,4-77,2	--
Malationa	0,5 – 10	0,987	0,21	0,71	--	--	111,9-114,8	84,5-106,5	99,4-110,6
Diazinona	0,3 – 5	0,994	0,11	0,36	--	81,5-87,6	101,7-119,5	106,0-111,3	--
Difenoconazol	0,3 – 5	0,994	0,12	0,39	--	86,7-116,0	109,3-111,1	80,9-81,8	--

Tabela 19. Faixa linear, coeficiente de correlação, recuperação e limite de detecção e de quantificação obtidos para o método proposto para determinação de agrotóxicos em suco de laranja fresco usando a membrana de polipropileno no sistema de HF-MMLLE.

Agrotóxicos	Faixa linear (mg L ⁻¹)	r	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Recuperação % (mg L ⁻¹)				
					0,1	0,3	0,5	2,5	9
Acefato	0,3 – 3	0,992	0,12	0,39	--	74,9-85,1	98,0-116,6	71,6-90,2	--
Carbendazim	0,3 – 7	0,992	0,13	0,46	--	78,3-113,4	73,2- 119,3	84,3- 103,3	--
Acetamiprido	0,3 – 7	0,995	0,10	0,33	--	68,3-95,7	72,8-86,1	78,4-96,2	--
Imidacloprido	0,3 – 7	0,992	0,13	0,46	--	63,6-106,7	71,4-112,3	76,7-83,1	--
Triclorfon	0,05 – 7	0,998	0,03	0,09	113,8-120,7	99,8-119,9	106,4-117,7	62,3-76,1	--
Ametrina	0,01 – 1	0,991	0,003	0,010	74,0-97,8	114,8-120,0	81,4-84,4	--	--
Bromacila	0,03 – 7	0,995	0,01	0,033	95,0-103,3	73,0-82,0	107,7-120,1	76,7-103,9	--
Carbofuram	0,03 – 10	0,996	0,01	0,04	99,1-114,3	96,7-113,2	107,4-118,1	73,0-98,1	102,2-103,7
Tiofanato- metil	0,5 – 10	0,993	0,16	0,53	--	--	85,3-89,9	81,1-101,0	68,6-84,2
Diuron	0,05 – 10	0,999	0,029	0,096	74,7-79,4	111,1-120,1	90,6-112,9	82,5-97,6	106,6-112,7
Pirimifós- metílico	0,2 – 10	0,992	0,07	0,25	--	101,9-112,3	87,3-89,98	105,8-116,3	96,4-111,0
Tebuconazol	0,5 – 7	0,992	0,15	0,50	--	--	96,5-103,6	104,8-118,4	--
Diflubenzurom	0,1 – 7	0,992	0,04	0,15	106,4-108,3	85,4-99,0	88,4-92,1	88,4-110,6	--
Malationa	0,5 – 7	0,996	0,15	0,49	--	--	95,1-97,2	73,2-97,2	--

Diazinona	0,5 – 7	0,995	0,14	0,46	--	--	90,8-99,6	76,0-94,1	--
Difenoconazol	0,1 – 7	0,991	0,06	0,19	97,5-99,2	102,4-103,4	93,9-102,2	91,1-101,9	--
Clorpirifós	0,2 – 10	0,994	0,08	0,26	--	79,1-108,4	103,5-106,8	110,6-118,3	82,1-107,2
Abamectina	0,2 – 10	0,995	0,06	0,21	--	103,7-119,0	90,9-112,4	90,3-110,4	86,0-96,1

3.4.4.6 Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de suco de laranja comercial industrializado e fresco

A metodologia desenvolvida foi aplicada na análise de diferentes amostras de suco de laranja adquiridos no mercado de Campinas, São Paulo, Brasil. Os agrotóxicos foram quantificados usando a técnica de padonização por adição padrão e os ensaios de recuperação foram realizados a partir da fortificação com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico. Esses ensaios foram realizados para as amostras de suco industrializado “light” e industrializado com adição de extrato de soja. As demais amostras não apresentaram diferenças significativas com relação a composição da curva analítica. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados são apresentados na Tabela 20.

Para o agrotóxico abamectina não foi possível atingir o limite máximo de resíduo permitido pela ANVISA, sendo que uma possível explicação para tal fato é sua elevada massa molar, o que prejudica a difusão do mesmo para membrana. Os agrotóxicos acefato, acetamiprido, imidacloprido, ametrina, bromacila, carbofuran, diazinona e difeconazol foram encontrados nas amostras em concentrações acima do limite máximo permitido. Observou-se que a ocorrência dos agrotóxicos

em sucos industrializados é significativamente maior quando comparado ao suco natural, possivelmente devido à concentração involuntária que ocorre durante o processo de fabricação destes sucos, na qual uma quantidade razoável de laranjas é utilizada, sendo a polpa concentrada e posteriormente adicionada aos sucos.

Tabela 20. Concentrações e recuperações obtidas para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em sucos de laranja comerciais utilizando o método proposto.

Agrotóxicos	Suco de laranja com extrato de soja		Suco de laranja (néctar)		Suco de laranja light		Suco de laranja com polpa Conc. encontrada (mg L ⁻¹)	Suco de laranja fresco natural Conc. encontrada (mg L ⁻¹)
	Concentração encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) (0,5 mg L ⁻¹)	Concentração encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) (0,5 mg L ⁻¹)	Concentração encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) (0,5 mg L ⁻¹)		
Acefato	0,46±0,05	63,4-105,2	0,90±0,06	108,2-118,2	--	75,3-120,7	--	0,69±0,09
Carbendazim	--	76,4-79,8	--	77,6-88,8	3,0±0,2	106,7-120,2	--	-
Acetamiprido	--	77,5-111,4	1,5±0,4	76,8-109,2	0,27±0,01	65,2-109,0	--	--
Imidacloprido	--	61,4-76,1	1,1±0,2	91,5-120,0	0,6±0,2	63,5-105,2	--	--
Triclorfon	--	69,1-90,6	--	107,1-119,5	--	--	--	--
Ametrina	--	67,1-72,0	0,034±0,001	72,8-113,6	0,5±0,2	92,1-120,1	0,033±0,002	--
Bromacila	--	66,9-76,2	0,20±0,01	118,2-120,3	--	100,3-120,3	--	--
Carbofurano	--	69,3-77,4	1,22±0,09	107,8-120,2	--	91,1-95,3	--	--
Tiofanato-metilico	--	107,8-112,8	0,88±0,08	100,2-114,1	4,5±0,8	98,7-119,8	--	--
Diurum	--	71,3-95,5	1,03±0,05	99,6-118,5	--	101,0-104,7	--	--

Pirimifós-metílico	--	80,2-92,9	--	75,2-100,2	1,13±0,04	118,2-120,4	--	--
Tebuconazol	--	74,6-75,1	--	104,7-118,6	2,8±0,1	79,7-120,8	--	--
Diflubenzurom	--	63,2-78,5	--	70,3-83,6	--	71,3-81,8	--	--
Malationa	--	101,6-107,1	1,6±0,3	69,2-101,7	4,34±0,09	84,3-108,9	--	--
Diazinona	--	66,4-69,4	0,77±0,04	86,0-87,9	1,13±0,02	97,5-107,0	--	--
Difenoconazol	--	61,0-90,1	0,83±0,03	70,7-71,0	0,83±0,03	81,5-91,3	--	--
Clorpirifós	--	63,5-67,6	0,43±0,02	88,5-108,8	--	--	--	--
Abamectina	0,5±0,1	99,5-117,1	--	94,8-112,5	--	--	--	--

3.4.5 Considerações parciais

O procedimento proposto, baseado em HF-MMLLE, para determinação de multirresíduo de agrotóxicos em suco de laranja de diferentes tipos apresentou limites de detecção (mg L^{-1}) aceitáveis de acordo com os LMR estabelecidos pela ANVISA, além de boa precisão e linearidade.

A metodologia desenvolvida apresenta as vantagens da técnica de HF-LPME, isto é, simplicidade, uso de microlitros de solventes orgânicos, efeito de matriz reduzido e ausência de efeito de memória. Entretanto, HF-LPME é relativamente ineficiente para extração de compostos com polaridades elevadas, sendo que o método HF-MMLLE desenvolvido apresentou boa eficiência para compostos com faixa de polaridade relativamente ampla.

Capítulo 4 – Conclusões gerais

4. Conclusões gerais

A microextração em fase líquida auxiliada por membrana porosa de polipropileno mostrou-se uma alternativa viável e eficiente como técnica de preparo de amostra para determinação de contaminantes orgânicos em amostras de alimentos e ambientais. Observa-se que para amostras estudadas a membrana oferece o “*clean up*” necessário para a análise posterior por cromatografia líquida ou gasosa, mesmo para amostras complexas, com preparação prévia mínima, e com concentrações dos analitos em nível de ng.

As metodologias desenvolvidas também mostram que utilizando a mesma membrana empregada na técnica de HF-LPME, pode ser superada uma de suas desvantagens, que é a relativa ineficiência na extração de compostos com polaridade mais elevada, como pode ser observado para a técnica de HF-LLME desenvolvida para determinação de multirresíduo de agrotóxicos.

Salienta-se a possibilidade da utilização da microextração em fase líquida auxiliada pela membrana para determinação de uma ampla faixa de concentração dos mais diversos analitos, desde ng, para o caso dos agrotóxicos organoclorados, até mg para agrotóxicos de diversas classes.

Na metodologia de HFRLM, desenvolvida para determinação de resíduos dos antibióticos da classe sulfonamidas em amostras de mel, obtiveram-se bons limites de detecção e quantificação, linearidade, repetibilidade e precisão intermediária, assim como boa limpeza de amostra e rapidez de análise. Salienta-se que a faixa linear compreende o limite máximo de resíduo estipulado pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) para esses compostos na referida matriz.

A metodologia utilizando HF-LLME, desenvolvida para determinação de multirresíduo de agrotóxicos em suco de laranja industrializado e fresco mostra a versatilidade da técnica para aplicação na extração de agrotóxicos de diferentes classes e em matrizes complexas. O método proposto apresenta bons limites de detecção e quantificação, linearidade, repetibilidade e precisão intermediária, assim como boa limpeza de amostra e rapidez de análise. As faixas de trabalho contemplam as concentrações estabelecidas pela ANVISA para as matrizes estudadas, desta forma, o método desenvolvido pode ser aplicado na análise de tais amostras com confiabilidade.

A combinação de LLME e MMSPE simultaneamente mostra a aplicabilidade da técnica para determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de morango, tomate e água de rio. Os limites de detecção e quantificação apresentados

pelo método são inferiores aos limites máximos de resíduos estabelecidos pelas agências reguladoras nacionais e internacionais para estes agrotóxicos em águas, portanto, o método desenvolvido e aplicável para as amostras, com preparo simplificado da amostra.

Portanto, novas metodologias foram desenvolvidas neste estudo, podendo ser aplicadas a diversos contaminantes nas matrizes estudadas, com as vantagens de baixo consumo de solventes orgânicos, baixo custo de material, excelente “clean-up” e rapidez nas análises.

Referências bibliográficas

¹ Câmara, V.M., Galvão, L.A.C.; A Patologia do trabalho numa perspectiva ambiental. In: Mendes R, editor. Patologia do trabalho. Rio de Janeiro, Atheneu, 1995, pg. 630.

² “Agrotóxicos: Autoridades trocam experiências sobre regulação.” Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em http://www.anvisa.gov.br/noticias/2009/100309_1.htm. acessado em junho/2009.

³ Sistema Nacional de Informações Tóxicos-Farmacológicas – SINITOX. Brasília: Ministério da Saúde/FIOCRUZ/SINITOX; 1998.

⁴ Caldas, E. D.; Souza, L.C.R.K. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. Revista de Saúde Pública, 34, 2000, pg. 529.

⁵ Caldas, E.D. Resíduos de pesticidas em alimentos e o Codex Alimentarius. Bol SBCTA 33, 1, 1999, pg. 50.

⁶ Conceição, M.H., Resíduos de Pesticidas em Tomates: Metodologia Analítica e Avaliação da Exposição Humana. Brasília, Tese de doutorado - UnB, 2002, pg. 125.

⁷ Melnikov, N. N.; Chemistry of pesticides; Editado por Gunther, F. A. e Gunther, J.D., traduzido a partir do idioma russo por Busbey, R. L.; Pestic. Biochem. Physiol.,1, 1971, pg. 492.

⁸ Brady, N.C., Natureza e propriedades dos solos. 7.ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1989.

⁹ Flores, A. V.; Ribeiro, J. N.; Queiroz, E. L. R.; Organoclorados: um problema de saúde pública; Ambient. Soc., Vol. VII nº. 2 jul./dez. 2004, pg. 111.

¹⁰ Farahani, H.; Yamini, Y.; Shariati, S.; Khalili-Zanjani, M.R.; Mansour-Baghahi, S.; Development of liquid phase microextraction method based on solidification of floated organic drop for extraction and preconcentration of organochlorine pesticides in water samples. Anal. Chim. Acta, 626, 2008, pg. 166.

¹¹ Zandoná, M.; Zappia, S.V. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: Resultado de cinco anos de monitoramento realizado

pela Secretaria de Saúde do Paraná. Pesticides: R. Ecotox. Meio Ambient. Curitiba, 3, 1993, pg. 49.

¹² Imoto, M. N.; Jesus, D.A.; Queiroz, V.S. e Nogueira. K.S. Apresentação dos Resultados do Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Produtos Orgânicos (frutas e legumes), realizado pelo Laboratório de Toxicologia do LACEN-PR. In: XII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos . ENAAL, CT-RS 12, Maceió - AL, 2000.

¹³ ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA . Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Brasília, 2002b. 18 p.Relatório técnico. Disponível em URL: www.anvisa.gov.br

¹⁴ Silva, F.C., Cardeal, Z.L., Carvalho, C.R.; Determinação de pesticidas organofosforados em água usando microextração em fase sólida e CGAR-EM. Quím. Nova, 22, 1999, pg. 197.

¹⁵ Saadeh, A.M.; Clinical and Sociodemographic Features of Acute Carbamate and Organophosphate Poisoning: A Study of 70 Adult Patients in North Jordan. Clinical Toxicology, 34, 1996, pg. 45.

¹⁶ Larini, L. Inseticidas. In: Larine, L.. Toxicologia, 2ª ed. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1993, pg. 136.

¹⁷ Bardin, P.G., Organophosphate and Carbamate Poisoning. Arch. Intern. Med., 154, 1994, pg. 1433.

¹⁸ Carlton, F.B.; Simpsom, W.M., Haddad, L.M. The Organophosphate and Other Insecticides. In: Haddad, L.M., Shannon, M.W., Winchester, J.F. Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose, Philadelphia, Pennsylvania, USA. WB Saunders Company, 3ª ed., 1998, pg. 836.

¹⁹ Lifshitz, M., Carbamate Poisoning in Early Childhood and in Adults. Clin. Toxicol., 35, 1997, pg. 25.

²⁰Robbs, C.F., Fungicidas. UFRRJ. Rio de Janeiro, 1991, pg. 33.

²¹ [ANVISA a] Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Agrotóxicos e Toxicologia. Monografias. Disponível na internet <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em 08 de março de 2006.

²² Tomlin, C., The Pesticides IVI Annual: Incorporating the Agrochemicals Handbook, 10^o ed. Cambridge: British Crop Protection Council, Royal Society of Chemistry, 1994, pg. 1341.

²³ [IPCS] International Programme on Chemical Safety. Pesticides Data Sheets. <<http://www.inchem.org/documents/pds/pds>>. Acesso em 25 de setembro de 2009.

²⁴ Solomon, K.R.; Baker, D.B.; Richards, R.P.; Dixon, K.R.; Klaine, S.J.; Lapoint, T.W.; Kendall, R.J.; Weisskopf, C. P.; Giddings, J.M.; Geisy, J.P.; Hall Jr., L.W.; Williams, W.M. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters - Annual review. Environ. Toxicol. Chem., 15, 1996, pg. 31.

²⁵ Cai, Z.; Wang, D.; Ma, W.T. Gas chromatography/ion trap mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters by an isotope dilution technique. Analytica Chimica Acta, 503, 2004, pg. 263.

²⁶ <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>, acessado junho/2010.

²⁷ <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm> acessado em junho/2010.

²⁸ Santos, S. M.; Henriques, M.; Duarte, A. C.; Esteves, V. I.; Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples, *Talanta*, 71, 2007, pg. 731.

²⁹ Hernández M., Borrull, F., Calull, M.; Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis, *Trends Anal. Chem.*, 22, 2003, pg. 7.

³⁰ Drews, J.; Drug Discovery: A historical perspective; *Science*, 287, 2000, pg. 1960.

³¹ Iyer, H.V.; History Revisited – Prontosil Red.; *J. Emerg. Med.*, 2008, pg. 35.

³² Rubin, R. P.; A brief history of great discoveries in pharmacology in celebration of the centennial anniversary of the founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacol. Rev.*, 59, 2007, pg. 289.

³³ Bernstein, J.E.; Lorincz, A.L.; Sulfonamides and sulfanes in dermatologic therapy. *Int. J. Dermatol.*, 20, 1981, pg. 81.

³⁴ Krebs, H.A., Speakman, J.C.,; The effect of pH on the solubility of sulphonamides. Proceedings of Biochemical Society, 24rd Meeting of Biochemical Society, Leeds, UK, 1945.

³⁵ European Commission, Council Directive 2001/110/EC, Of. J. Eur. Commun. L10/47, 20 December 2001.

³⁶ Kovalczuk, T.; Lacina, O.; Jech, M.; Poustka, J.; Hajšlová, J.; Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Addict. Contam., 25, 2008, pg. 444.

³⁷ Sandahl, M.; Mathiasson, L.; Jönsson, J.A.; Determination of thiophanate-methyl and its metabolites at trace level in spiked natural water using the supported liquid membrane extraction and the microporous membrane liquid-liquid extraction techniques combined on-line with high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 893, 2000, pg. 123.

³⁸ Škrbić, B.; Predojević, Z.; Levels of organochlorine pesticides in crops and related products from Vojvodina, Serbia: Estimated dietary intake. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 54, 2008, pg. 628.

³⁹ Abhilash, P. C.; Jamil, S.; Singh, N.; Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. *J. Chromatogr. A*, 1176, 2007, pg. 43.

⁴⁰ Hernández-Borges, J.; Cabrera, J. C.; Rodríguez-Delgado, A.; Hernández-Suárez, E. M.; Saúco, V. G.; Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain). *Food Chem.*, 113, 2009, pg. 313.

⁴¹ Khalili-Zanjani, M.R.; Yamini, Y.; Yazdanfar, N.; Shariati, S.; Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 606, 2008, pg. 202.

⁴² Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S., Fundamentos de cromatografia. Editora UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2006.

⁴³ Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.; O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova*, 31, 2008, pg. 623.

⁴⁴ Hoffmann, E.; Stroobant, V.; Mass Spectrometry: Principles and Applications. 3ª edição, New York, Wiley, 2007.

⁴⁵ Kaale, E.; Chambuso, M.; Kitwala, J.; Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. Food Chem., 107, 2008, pg. 1289.

⁴⁶ Hu, Y.; Yang, X.; Wang, C.; Zhao, J.; Li, W.; Wang, Z.; A sensitive determination method for carbendazim and thiabendazole in apples by solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Food Addit. Contam., 25, 2008, pg. 314.

⁴⁷ Maldaner, L.; Santana, C. C.; Jardim, I. C. S. F.; HPLC determination of pesticides in soybeans using matrix solid phase dispersion. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 31, 2008, pg. 972.

⁴⁸ Nunes, G.S.; Alonso, R.M.; Ribeiro, M.L.; Barceló, D.; Determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in some fruits and vegetables using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 888, 2000, pg. 113.

⁴⁹ Wang, J.; Cheung, W.; Grant, D.; Determination of pesticides in apple-based infant foods using liquid

chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2005, pg. 528.

⁵⁰ Botitsi, H.; Economou, A.; Tsipi, D.; Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 2007, pg. 1685.

⁵¹ Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B.; Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 2007, pg. 1773.

⁵² Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tisdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A.; Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometry detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 2007, pg. 1697.

⁵³ Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y.; Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia (Spain). *Food Control.*, 17, 2006, pg. 841.

⁵⁴ Kmešár, B.; Fodor, P.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Martínez-Uroz, M. A.; Valverde, A.; Fernández-Alba, A. R.; Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1215, 2008, pg. 37.

⁵⁵ Picó, Y.; Kozmutza, C.; Evaluation of pesticides residues in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 2007, pg. 1805.

⁵⁶ Durden, D. A.; Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *J. Chromatogr. B*, 850, 2007, pg. 134.

⁵⁷ Pan, J.; Xia, X.; Liang, J.; Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ultrason. Sonochem.*, 15, 2008, pg. 25.

⁵⁸ Kataoka, H.; New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem.*, 22, 2003, pg. 232.

⁵⁹ Lanças, F.M.; *Extração em fase sólida*. São Carlos, Editora RiMa, 2004.

⁶⁰ Queiroz, S.C.N.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quím. Nova*. 24, 2001, pg. 68.

⁶¹ Jönsson, J.A.; Mathiasson, L.; Membrane-based techniques for sample enrichment. *J. Chromatog. A*, 902, 2000, pg. 205.

⁶² Cordero, B.M.; Pavón, J.L.P.; Pinto, C.G.; Laespada, M.E.F.; Martinez, R.C.; Gonzalo, E.R.; Analytical applications of membrane extraction in chromatography and electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 902, 2000, pg. 195.

⁶³ Liu, H., Dasgupta, P.K., Analytical chemistry in a drop. *Trends Anal. Chem.* 68 (1996).

⁶⁴ Kramer, K.E., Andrews A.R.J., Screening method for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow

fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization. *J. Chromatogr. B.* 760, 2001, pg. 27.

⁶⁵ Jönsson, J. A., Mathiasson, L., Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. *Trends Anal. Chem.*, 18, 1999, pg. 325.

⁶⁶ Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 71, 1999, pg. 2650.

⁶⁷ Rasmussen, K. E.; Pedersen-Bjergaard, S.; Developments in hollow fiber-based liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, 23, 2004, pg. 1.

⁶⁸ Ulrich, S. Solid – phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A*, 902, 2000, pg. 67.

⁶⁹ Ho, T.S. ; Pedersen-Bjergaard,S.; Rasmussen, K.E.; Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction – comparison with conventional liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A*, 3, 2002, pg. 963.

⁷⁰ Ho, T.S. ; Pedersen-Bjergaard,S.; Rasmussen, K.E.; Liquid-phase microextraction in protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. *Analyst*, 127, 2002, pg. 608.

⁷¹ Ren, Z., Zhang,W., Li, H., Lin, W.; Mass transfer characteristics of citric acid extraction by hollow fiber renewal liquid membrane. *Chem. Eng. Sci.* 146, 2009, pg. 220.

⁷² Ren, Z., Zhang, W., Liu, Y., Dai, Y., Cui, C.; New liquid membrane technology for simultaneous extraction and stripping of copper(II) from wastewater. *Chem. Eng. Sci.*, 62, 2007, pg. 6090.

⁷³ Carletto J. S., Luciano, R.M., Bedendo, G.C., Carasek, E., Simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for pre-concentration of Cd(II) in environmental samples and detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 638, 2009, pg. 45.

⁷⁴ Luciano, R.M.; Bedendo, G.C.; Carletto, J.S.; Carasek, E.; Isolation and preconcentration of Cd(II) from environmental samples using polypropylene porous membrane in a hollow fiber renewal liquid membrane extraction procedure and determination by FAAS. *J. Hazard. Mater.* 177, 2010, pg. 567.

⁷⁵ Zorita, S., Barri, T., Mathiasson, L.; A novel hollow-fibre microporous membrane liquid-liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. *J. Chromatogr. A*, 1157, 2007, pg. 30.

⁷⁶ Montes, R.; Rodríguez, I.; Rubi, E.; Ramil, M. and Cela, R.; Suitability of polypropylene microporous membranes for liquid- and solid-phase extraction of halogenated anisoles from water samples. *J. Chromatogr. A*, 1198, 2008, pg. 21.

⁷⁷ Kujawski, M.W., Namies´nik J., Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. *Trends Anal. Chem.*, 27, 2008, pg. 785.

⁷⁸ Niessen, W.M.A.; Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogra. A*, 812, 1998, pg. 53.

⁷⁹ Kristof, E.M., Guo-Fang Zhang, Willy, E. Lambert. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography

with post-column derivatization and fluorescence detection. J. Chromatogra. A, 1047, 2004, pg. 85.

⁸⁰ Thompson, T.S., Noot, D.K., Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 551, 2005, pg. 168.

⁸¹ Verzeznassi, L., Savoy-Perroud, M.-C., Stadler, R.H., Application of liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. J. Chromatogr. A, 977, 2002, pg. 77.

⁸² Hammel, Y.A., Mohamed, R., Gremaud, E., LeBreton, M.; Guy, P.A., Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogra. A, 1177, 2008, pg. 58.

⁸³ Shah, F.U., Barri, T., Jönsson, J.A., Skog K., Determination of heterocyclic aromatic amines in human urine by using hollow-fibre supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-ultraviolet detection system. J. Chromatogr. B, 870, 2008, pg. 203.

⁸⁴ García-López, M., Rodríguez, I., Cela, R., Evaluation of liquid–liquid microextraction using polypropylene microporous

membranes for the determination of organophosphorus flame retardants and plasticizers in water samples. *Anal. Chim. Acta*, 625, 2008, pg. 145.

⁸⁵ Swain, B., Jeong, J., Lee, J., Lee, G., Extraction of Co(II) by supported liquid membrane and solvent extraction using Cyanex 272 as an extractant: A comparison study, *J. Memb. Sc.*, 288, 2007, pg. 139.

⁸⁶ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-Brazil/ Instrução Normativa N° 14, de 25 de maio de 2009/Anexo IV – Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em mel – PNCRC/2009.

⁸⁷ Barros Neto, B; Scarminio, J.S. e Bruns, R.E.; Planejamento e otimização de experimentos. Ed. Unicamp, Campinas, São Paulo, 1995.

⁸⁸ Arthur, C.L., Pawliszyn, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62, 1990, pg. 2145.

⁸⁹ Pawliszyn, J., New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. *Trends Anal. Chem.*, 14, 1995, pg. 113.

⁹⁰ Gbatu, T.P., Sutton, J K., Caruso, L.A.. Development of new SPME fibers by sol-gel technology for SPME-HPLC determination of organometals. *Anal. Chim. Acta*, 402, 1999, pg. 67.

⁹¹ Lee, J., Lee, H.K., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S.; Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. *Anal. Chim. Acta*, 624, 2008, pg. 253.

⁹² Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A.. Liquid-phase microextraction techniques in pesticide residue analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70, 2007, pg. 195.

⁹³ Bolanos, P.P., Romero-González, R., Garrido Frenich A.G.,Martínez J.L. Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1208, 2008, pg. 16.

⁹⁴ Carpinteiro, M.I., Rodríguez, I., Cela, R., Ramil, M.. Headspace solid-phase microextraction of halogenated toluenes in environmental aqueous samples with polypropylene microporous membranes. *J. Chromatogr. A*, 1216, 2009, pg. 2825.

⁹⁵ Pan, H., Ho, W.; Determination of fungicides in water using liquid phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *Anal. Chim. Acta*, 527, 2004, pg. 61.

⁹⁶ Barri, T., Bergström, S., Hussén, A., Norberg, J., Jönsson, J.Å., Extracting Syringe for determination of organochlorine pesticides in leachate water and soil-water slurry: A novel technology for environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, 1111, 2006, pg. 11.

⁹⁷ L. Zhao, H.K. Lee, Determination of phenols in water using liquid phase microextraction with back extraction combined with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 919, 2001, pg. 381.

⁹⁸ Romero-González R.; Garrido A.F.; Martínez J.L.V.; Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 76, 2008, pg. 211.

⁹⁹ Blasco, C.; Font, G.; Pico, Y.; Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 970, 2002, pg. 201.

¹⁰⁰ <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>, acessado junho/2010.

¹⁰¹ Alder, L.; Greulich, K.; Kempe, G.; Vieth, B.; Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS. *Mass Spectrom. Rev.*, 25, 2006, pg. 838.

¹⁰² Soler C.; Picó Y.; Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *Trends Anal. Chem.*, 26, 2007, pg. 103.

¹⁰³ Klein, J., Alder, L., Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops, *J. AOAC Int.*, 86, 2003, pg. 1015.

¹⁰⁴ Hernandez, F.; Pozo, O.J.; Sancho J.V.; Bijlsma L.; Barreda A.; Pitarch E.; Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-

amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *J. of Chromatogra. A*, 1109, 2006, pg. 242.

¹⁰⁵ Sabatino, L.; Traulo, P.; Gagliano, G.; Gargano, M.; Panto, V.; Gambino, G.L.; Scordino, M.; LC-MS/MS detection of fungicide guazatine residues for quality assessment of commercial citrus fruit. *Eur. Food Res. Technol.*, 227, 2008, pg. 1339.

¹⁰⁶ Rodrigues, A. M.; Ferreira, V.; Cardoso, V.V.; Ferreira, E.; Benoliel, M.J.; Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogra. A*, 1150, 2007, pg. 267.

¹⁰⁷ Jessome, L.L.; Volmer, D.A.; Ion suppression: A major concern in mass spectrometry. *LC GC North America*, 24, 2006, pg. 83.

¹⁰⁸ Mei, H.; Hsieh, Y.; Nardo, C.; Xu, X.; Wang, S.; Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application drug discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, pg. 97.